UNTERSUCHUNG DES INTER-ALPHA-TRYPSIN-INHIBITORS ALS VORSTUFE DER SÄURESTABILEN PROTEASEN-INHIBITOREN IM MENSCHLICHEN SERUM UND HARN

Wolfgang Hilla

1979

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 268177

AUS DER HALS-, NASEN- UND OHRENKLINIK DER

UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. H. H. Naumann

UNTERSUCHUNG DES INTER-ALPHA-TRYPSIN-INHIBITORS ALS VORSTUFE DER SÄURESTABILEN PROTEASEN-INHIBITOREN IM MENSCHLICHEN SERUM UND HARN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von

Wolfgang H i l l a

aus München

München 1979

Mit Genehmigung
des
Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. K. Hochstrasser
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. H. H. Naumann
Dekan:	Prof. Dr. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 8.2.1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
A. Einleitung	3 - 4
B. Theoretischer Teil	5 - 17
I. Physiologische Funktion der Proteasen-Inhibitoren	5
II. Wirkungsmechanismus der Proteasen-Inhibitoren	5 - 8
III. Struktur und Molekulargewicht der Proteasen-Inhibitoren	8 - 9
IV. Die antiproteolytische Aktivität des menschlichen Serums	10 - 12
1. Das Alpha-1-Antitrypsin 2. Das Alpha-1-Antichymotrypsin 3. Der Inter-Alpha-Trypsin-Inhibitor 4. Das Alpha-2-Makroglobulin 5. Die säurestabilen Proteasen-Inhibitoren	
V. Die antiproteolytische Aktivität des menschlichen Bronchialsekrets	12 - 15
1. Das Alpha-1-Antitrypsin 2. Der Bronchialsekret-Inhibitor	
VI. Die antiproteolytische Aktivität des menschlichen Harns	15 - 17
C. Eigene Untersuchungen	18 - 79
I. Der säurestabile Proteasen-Inhibitor des Serums und des Harns mit dem Molekulargewicht 34.000 (I 34)	18 - 26
1. Untersuchungen und Ergebnisse	18 - 24
2. Diskussion der Ergebnisse	24 - 26
II. Der Inter-Alpha-Trypsin-Inhibitor (ITI) als "precursor" der säurestabilen Inhibitoren des menschlichen Serums und Harns	27 - 55

	Seite
1. Fragestellung	27 - 28
2. Untersuchungen und Ergebnisse	28 - 44
a) Isolierung der ITI-Derivate	28 - 32
b) Untersuchung des gereinigten ITI	32 - 39
c) Untersuchung der ITI-Derivate	40 - 44
3. Diskussion der Ergebnisse	44 - 55
III. Untersuchung der Trypsin- und Chymotrypsin-Komplexe säurestabiler Inhibitoren des menschlichen Bronchialsekrets, des Serums und des Harns	56 - 69
1. Der Bronchialsekret-Inhibitor	56 - 63
a) Fragestellung und methodisches Vorgehen	56
b) Untersuchungen und Ergebnisse	57 - 63
c) Diskussion der Ergebnisse	63 - 64
2. Die Plasma-Trypsin-Inhibitoren	64 - 68
a) Fragestellung und methodisches Vorgehen	64 - 65
b) Untersuchungen und Ergebnisse	65 - 68
c) Diskussion der Ergebnisse	69
IV. Bestimmung der Inhibitorkonstanten säurestabiler Proteasen-Inhibitoren des menschlichen Bronchialsekrets, des Serums und des Harns	70 - 80
1. Fragestellung	70
2. Methodisches Vorgehen	70 - 72
3. Ergebnisse und deren Diskussion	72 - 79
a) Der Bronchialsekret-Inhibitor	72 - 74
b) Die säurestabilen Plasma-Trypsin-Inhibitoren	75 - 80
D. Zusammenfassung	81
E. Materialien und Methoden	82 - 86
I. Materialien	
II. Methoden	83 - 86
F. Literaturverzeichnis	87 - 89

A. EINLEITUNG

Die Gesamtheit der chemischen Umsetzungen im Organismus, die wir Stoffwechsel nennen, ist nur möglich durch die Wirkung bestimmter Katalysatoren, welche wir als Enzyme oder Fermente bezeichnen. Die von ihnen umgesetzten Stoffe heißen Substrate. Chemisch gehören alle bisher bekannten Enzyme zu den Proteinen oder Proteiden. Für ihre katalytische Wirksamkeit ist das "aktive Zentrum" verantwortlich, das aus definierten Teilen der Polypeptidkette durch eine besondere Faltung entsteht.

Viele Enzyme brauchen bestimmte Ionen für ihre Aktivität, können aber auch durch verschiedene Stoffe irreversibel gehemmt werden. Ein sehr bekanntes Beispiel ist die Blockierung der Atmungsfermente durch Cyanid, woraufhin die Sauerstoffutilisation der Zelle erlischt.

Dagegen spielt die reversible Hemmung von Enzymen eine wichtige Rolle bei der Stoffwechselregulation: Hierbei konkurriert der Hemmstoff mit dem Substrat um die Bindung am aktiven Zentrum des Enzyms. In genügend hoher Konzentration kann er das Substrat völlig verdrängen und dadurch die Reaktion blockieren. Solche Enzym-Inhibitoren sind ebenfalls Proteine und kommen sowohl im pflanzlichen als auch im tierischen Organismus vor.

Besonders genaue Kenntnisse besitzt man bei der Gruppe der Proteasen-Inhibitoren. Viele dieser Hemmstoffe sind mit den Methoden der Proteinchemie rein dargestellt und chemisch charakterisiert worden. Einige Inhibitoren wurden sogar in ihrer Aminosäuresequenz und Raumstruktur aufgeklärt.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit den s ä u r e s t a b i l e n Proteasen-Inhibitoren des menschlichen Bronchialsekrets, des Serums und des Harns. Neben ihrer Hemmspezifität und Komplexierbarkeit versuchten wir den Stoffwechselweg des Serum- bzw. Harn-Inhibitors aufzuzeigen. Da dieser Hemmstoff bei Nierenerkrankungen signifikant von seiner Normkonzentration abweicht, stellte sich uns die Frage, in welcher Weise diese Veränderung durch Nephropathien bedingt wird. Dabei kam es weniger darauf an, klinische Korrelationen aufzustellen, vielmehr ging es darum, grundlegende Erkenntnisse über die säurestabilen Proteasen-Inhibitoren zu gewinnen.

B. THEORETISCHER TEIL

I. Physiologische Funktion der Proteasen-Inhibitoren

Pflanzliche und tierische Organismen müssen sich vielerorts mit proteolytischer Aktivität auseinandersetzen. So könnten Proteasen neben ihrer physiologischen Aufgabe (z. B. Abbau des Nahrungseiweißes durch Verdauungsenzyme oder Zerstörung von infektiösen Keimen durch leukozytäre Proteasen) auch körpereigene, biologisch wichtige Proteine, sowie Gewebe mit Proteinstruktur andauen. Deshalb kommen Proteasen und deren Inhibitoren zumeist nebeneinander im Gewebe vor, so daß lediglich eine zeitlich und räumlich begrenzte Proteolyse stattfindet. Daneben schützen sich viele Lebewesen mit Enzym-Inhibitoren auch vor körperfremden Proteasen, z. B. der Pilze und Bakterien und verhindern auf diese Weise deren Eindringen (18, 27).

II. Wirkungsmechanismus der Proteasen-Inhibitoren

Die Hemmwirkung der Inhibitoren beruht in der Regel auf einer reversiblen Komplexbildung mit der jeweiligen Protease:

$$\text{Inhibitor} + \text{Protease} \rightleftarrows \text{Protease-Inhibitor-Komplex}$$

Die Gleichgewichtslage dieser Reaktion wird durch die Inhibitorkonstante K_i ausgedrückt. K_i wird

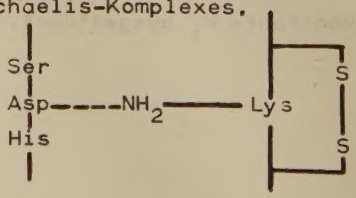
sowohl vom pH als auch vom Verhältnis der Enzym- zur Inhibitor-Konzentration beeinflußt.

$$K_i = \frac{P \times I}{PI} \text{ Molar}$$

P = Molare Konzentration der Protease
I = Molare Konzentration des Inhibitors
PI = Molare Konzentration des Komplexes

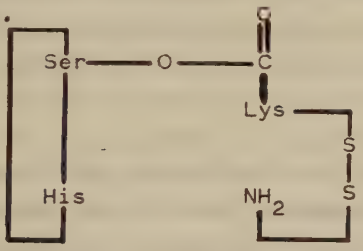
Bei der Bildung des Protease-Inhibitor-Komplexes lagert sich das reaktive Zentrum des Inhibitors an das aktive Zentrum des Enzyms an. Normalerweise würde der nun gebildete Enzym-Substrat-Komplex (Michaelis-Komplex) in den Enzym-Produkt-Komplex übergehen, woraufhin das Reaktionsprodukt abdissoziiert. Dieses Reaktionsmodell kann aber bei der Reaktion zwischen Inhibitor und Protease auf verschiedenen Stufen unterbrochen sein (8).

1) Hemmung ist bereits durch einfache Anlagerung einer definierten funktionellen Gruppe des Inhibitormoleküls an das aktive Zentrum des Enzyms möglich. Man diskutiert die Anlagerung der Epsilon-Aminogruppe des Lysinrests oder der Guanidinogruppe des Arginins auf Inhibitorseite an den Asparaginsäurerest im aktiven Zentrum des Trypsins (1, 2). Es handelt sich dabei um eine einfache salzartige Verbindung ohne Veränderung des Inhibitors. Der Reaktionsmechanismus entspricht der Bildung eines Michaelis-Komplexes.



Dieser Hemmtyp kann bei Inhibitoren aus Rinder- oder Schaflunge angenommen werden: Die Inhibitoren lassen sich nämlich ohne Modifizierung aus Komplexen zurückerhalten (10). Es fand also lediglich eine limitierte Proteolyse statt, welche über die Bildung eines Michaelis-Komplexes nicht hinausging.

2) Es kann nun zur Spaltung einer bestimmten Peptidbildung im Inhibitor kommen, ohne daß ein Zerfall in die Proteolyseprodukte eintritt. Die unter 1) beschriebene Komplexbildung geht dabei im Sinne einer echten Proteolyse weiter, bleibt jedoch jetzt auf der Stufe des Enzym-Produkt-Komplexes stehen (9).



Die Bildung dieses Acyl-Enzym-Komplexes scheint bei verschiedenen Pankreasinhibitoren mit nur teilweiser Modifizierbarkeit vorzuliegen, während bei vollständig modifizierbaren und in dieser Form voll aktiven pflanzlischen Inhibitoren Enzym-Produkt-Komplexe gebildet werden (10).

3) Falls ein Enzym-Inhibitor-Komplex eine hohe Dissoziationskonstante (siehe oben) besitzt, liegen andauernd geringe Mengen freier Proteasen vor.

Die Existenz freier proteolytischer Aktivität kann aber dazu führen, daß weitere Peptidbindungen im Inhibitormolekül angegriffen werden, wodurch der Inhibitor seine Stabilität und Hemmwirkung verliert. Laskowski prägte dafür den Begriff "temporary inhibition" (17).

III. Struktur und Molekulargewicht der Proteasen-Inhibitoren

Bei den bisher entdeckten natürlichen Proteasen-Inhibitoren handelt es sich durchwegs um Polypeptide, die in wenigen Fällen auch einen unterschiedlichen Kohlehydratanteil besitzen können. Ihr Molekulargewicht bewegt sich zwischen 6000 (Pankreasininhibitoren) und 820 000 (Alpha-2-Makroglobulin).
Bei vielen Inhibitoren führte man eine Sequenzanalyse durch und deckte dabei interessante Struktur-Wirkungs-Beziehungen auf: So bieten spezielle Trypsin-Inhibitoren aus dem Pankreas und aus Maissamen innerhalb großer Bereiche der Aminosäuresequenz keinen Angriffspunkt für Trypsin, das bekanntlich Lysin-X- und Arginin-X-Bindungen spaltet (8). Dieser Befund erklärt die außerordentliche Resistenz der Hemmstoffe gegen Trypsin. Wahrscheinlich liegen die unangreifbaren Sequenzen an der Oberfläche des Inhibitormoleküls (das aktive Zentrum ist natürlich ausgenommen).

Dafür spricht auch, daß schon geringe Störungen der Tertiärstruktur mit einem Verlust der Hemmwirkung einhergehen. Die durch Reduktion der S-S-Brücken oder Auflösung der H-Brücken bedingte Veränderung der Tertiärstruktur führte zur Inaktivität der Inhibitoren. Gleichzeitig wurden sie für Trypsin angreifbar (28, 29).

Hinsichtlich des aktiven Zentrums lassen sich zwei Typen von Trypsin-Inhibitoren unterscheiden. Bei den sog. "Lysin-Inhibitoren" scheint die Aminosäure Lysin für die Ausbildung des Trypsin-Inhibitor-Komplexes wesentlich zu sein. Durch Acylierung eben dieses Lysinrests lassen sich die Inhibitoren inaktivieren (6, 7). Dagegen konnte man bei den sog. "Arginin-Inhibitoren" bestimmte Argininreste als aktive Zentren identifizieren. Durch Umsetzung der Guanidinogruppe des Arginins, z. B. mittels Butadion, kann man eine Inaktivierung des Inhibitors erreichen. Beim Zustandekommen des Trypsin-Inhibitor-Komplexes entsteht also eine spezielle Bindung zwischen einem Lysin- bzw. Argininrest des Inhibitors und dem aktiven Zentrum des Enzyms. Dafür spricht auch, daß Trypsin bevorzugt Arginin-X- und Lysin-X-Bindungen spaltet. Laskowski gelang es sogar, durch Abspalten des Arginins und Ersatz durch Lysin, einen "Arginin-Inhibitor" in einen "Lysin-Inhibitor" umzuwandeln (26).

Für die Stabilisierung des Enzym-Inhibitor-Komplexes ist jedoch die Ausbildung weiterer Wasserstoffbrükken- und Ionenbindungen zwischen Enzym und Inhibitor notwendig, wie durch Röntgenanalysen von Enzym-Inhibitor-Komplexen nachgewiesen werden konnte (24).

IV. Die antiproteolytische Aktivität des menschlichen Serums

1) Das Alpha-1-Antitrypsin

Dieser polyvalente Inhibitor ist das Hauptprotein der Alpha-1-Globulinfraktion des Serums. Er ist ein Hemmstoff für Trypsin und Chymotrypsin, daneben noch für Plasmin, Pankreas-Kallikrein und Elastase. Außerdem hemmt er Leukocytenproteasen. Das Alpha-1-Antitrypsin stellt 90 % der Trypsin-hemmenden Kapazität des Serums dar (30).

2) Das Alpha-1-Antichymotrypsin

Es handelt sich hierbei um einen spezifischen Chymotrypsin-Inhibitor, der im Post-Albumin-Bereich des Humanserums zu finden ist (30).

3) Der Inter-Alpha-Trypsin-Inhibitor (ITI)

Die elektrophoretische Beweglichkeit gab diesem Inhibitor seinen Namen. Er läßt sich zwischen der Alpha-1- und der Alpha-2-Globulinfraktion nachweisen. Über seine physiologische Funktion war bisher nichts bekannt. Der ITI gilt als Spurenprotein, er bewirkt nur etwa 1 % der antitryptischen Aktivität des Serums. Im Gegensatz zu seiner Hemmwirkung gegen Trypsin ist die Wirkung gegen Chymotrypsin und Plasmin nur noch angedeutet (30).

4) Das Alpha-2-Makroglobulin

Auf diesen polyvalenten Inhibitor entfallen die restlichen 10 % der Trypsin-inhibitorischen Kapazität des Serums. In sein relativ breites Hemmspektrum fallen unter anderem Chymotrypsin, Plasmin, Plasma-Kallikrein, Thrombin und Elastase (14).

5) Die säurestabilen Proteasen-Inhibitoren

Die oben aufgeführten Hemmstoffe sind neben dem C-1-Inaktivator und dem Antithrombin der säurelabilen antiproteolytischen Aktivität des Serums zuzuordnen. Nach Deproteinisierung (Fällung mit Perchlorsäure) von Humanserum verbleiben bis zu 3 % der insgesamt vorhandenen antiproteolytischen Aktivität im Überstand. Es handelt sich hierbei um die sog. säurestabile antitryptische Wirkung des Serums. Diese entspricht bei gesunden Personen 5 bis 10 Trypsin-Inhibitor-Milleinheiten (ImU) mit einem Häufigkeitsmaximum bei 8 ImU (15). Bei Nephropathien unterschiedlicher Genese konnte ein Anstieg dieser Aktivität bis zum 30-fachen Wert der Norm beobachtet werden. Hochstrasser und Mitarbeiter wiesen nach, daß der Anstieg des Inhibitorspiegels früher signifikant wird als die üblicherweise zur Funktionsbeurteilung der Niere verwendete Bestimmung der Serumkreatininkonzentration. Die Brauchbarkeit der Inhibitorbestimmung für klinische Zwecke wurde bei der Funktionskontrolle transplantierter Nieren überprüft: Abstossungskrisen ließen sich in allen Fällen 24 bis 48

Stunden vor einem manifesten Kreatininanstieg im Serum voraussagen (13).
Daneben gelang es durch Affinitätschromatographie (reversible Adsorption an wasserunlösliches Trypsinharz), sowohl aus enteiweißtem als auch aus nativem Humanplasma zwei säurestabile Proteasen-Inhibitoren zu isolieren. Das Molekulargewicht (bestimmt mittels Molekularsiebchromatographie) betrug jeweils 22.000 und 44.000. Beide Inhibitoren zeigten praktisch die gleiche spezifische Aktivität (= ImU/µg Protein) und die gleiche Aminosäurezusammensetzung. Deshalb wurde der Inhibitor mit den Molgewicht von 44.000 als Dimeres des Inhibitors mit dem Molgewicht von 22.000 definiert. Erhärtet wurde diese Annahme durch die Tatsache, daß die beiden säurestabilen Inhibitoren des Humanplasmas eine identische Kreuzreaktion mit dem ITI zeigen (13).

V. Die antiproteolytische Aktivität des menschlichen Bronchialsekrets

1) Das Alpha-1-Antitrypsin

Bekannterweise kommen die meisten Proteine des Blutserums ebenfalls in Bronchialsekreten vor. Darunter befindet sich auch das Alpha-1-Antitrypsin, welches etwa 30 % der antiproteolytischen Wirkung dieses Sekrets repräsentiert. Beim erblichen Mangel an Alpha-1-Antitrypsin (homo-

oder heterozygot) werden in gesteigertem Maße Lungenemphyseme beobachtet. Die Entstehung dieser Emphyseme wird auf eine erhöhte proteolytische Aktivität in den Alveolen als Folge des ausfallenden inhibierenden Systems zurückgeführt, denn Membranen und elastische Fasern des Lungenparenchyms werden nun verstärkt durch Proteasen zerfallender Leukozyten angegriffen. Erwartungsgemäß müßten sich aber auch gleichzeitig vermehrt Bronchitiden und Bronchiektasien entwickeln. Da dies aber nicht der Fall ist, wird das Alpha-1-Antitrypsin als ein überwiegend distal, also im Bereich der Lungenalveolen, wirkender Hemmstoff angesehen (22; 23).

2) Der Bronchialsekret-Inhibitor (BSI)

Lange Zeit wurde die gesamte antiproteolytische Wirkung des Bronchialsekrets nur auf das Vorkommen von Alpha-1-Antitrypsin zurückgeführt. Diese Meinung mußte jedoch revidiert werden, als Reichert und Hochstrasser einen niedermolekularen, säurestabilen Proteasen-Inhibitor im Bronchialsekret nachwiesen (23). Ihm kommt eine wichtige Schutzfunktion sowohl im Bereich der Nasenhaupt- und -nebenhöhlen, als auch im Bronchialbaum zu: Gerade die Luftwege sind in besonderem Maße infektionsgefährdet. Nicht nur die Ansiedlung von Keimen (Auftreten bakterieller Proteasen), sondern auch die dadurch bedingte Einwanderung von Leukozyten und deren Zerfall führen zum Freiwerden einer beträchtlichen proteoly-

tischen Aktivität. Deshalb scheint die Sekretion eines zweiten Proteasen-Inhibitors im Bereich des Flimmerepithels sehr sinnvoll zu sein. Die physiologische Aufgabe des BSI steht mit seinem Hemmspektrum in Einklang: Neben Trypsin und Chymotrypsin hemmt der BSI auch die bakterielle Protease Pronase und leukozytäre Proteasen.

Auf den BSI entfallen die restlichen 70 % der im Nasen- und Bronchialsekret feststellbaren antiproteolytischen Aktivität. Bei gesunden Kontrollpersonen liegen im Durchschnitt bis zu 70 % des im Sekret vorhandenen niedermolekularen Inhibitors in freier Form vor. Dagegen ist bei Patienten mit Bronchitiden die Menge des frei verfügbaren BSI im Durchschnitt auf 30 % erniedrigt. Offensichtlich wird hierbei die durch den niedermolekularen Inhibitor gewährleistete Schutzfunktion durch vermehrten Proteasenanfall aus zerfallenden Leukozyten in Anspruch genommen (16). Der Nachweis von maskiertem, d. h., mit Leukozyten-Proteasen verbundenem BSI, in purulenten Sekreten gelang auch direkt: Diese Proteasen-Inhibitor-Komplexe konnten sowohl mit Antiseren gegen Leukozytenelastase als auch mit Antiseren gegen BSI zur Reaktion gebracht werden.

Der BSI (Molekulargewicht ca 13.000) zeigt,ähnlich wie der säurestabile Seruminhibitor, Antigenverwandschaft mit dem ITI des Serums,d. h., er bildet Immunpräzipitate mit spezifischen Antikörpern gegen den ITI (11). Beide Inhibitoren

scheinen nicht nur die Antigendetermination gemeinsam zu haben, sie besitzen wahrscheinlich auch das gleiche Hemmzentrum, denn beide Hemmstoffe sind sog. "Arginin-Inhibitoren" mit einem Argininrest im Hemmzentrum. Der BSI muß aber als spezifisches Produkt des Flimmerepithels angesehen werden, denn er kommt zumindest in der Form wie im Bronchialsekret nicht im Blutplasma vor (12).
Die Antigenverwandtschaft zwischen BSI und ITI legte die Vermutung nahe, daß der ITI den "precursor" des BSI darstellt. Um daraufhin den Bildungsmechanismus des BSI aufzuklären, versuchte man zunächst auf indirektem Wege, nämlich durch klinische Untersuchungen, weitere Beziehungen zwischen beiden Inhibitoren zu finden. Überraschenderweise fand man bei Bronchitikern, verglichen mit einem Probandenkollektiv ohne Atemwegserkrankungen, eine signifikante Erhöhung des ITI-Spiegels im Serum. Bei diesen Patienten bewirkt also der erhöhte Verbrauch an BSI keine Verminderung des "precursor-pool", sondern anscheinend eine reaktive Mehrproduktion von ITI, die sogar zu einem Anstieg der ITI-Konzentration im Serum führt.

Es sei noch darauf hingewiesen, daß auf Grund des Vergleichs der tryptischen Peptide aus dem BSI mit denen der säurestabilen Plasma-Inhibitoren keine direkten strukturellen Beziehungen zwischen dem BSI und den säurestabilen Plasma-Inhibitoren bestehen (12).

VI. Die antiproteolytische Aktivität des menschlichen Harns

Die Existenz der antiproteolytischen Eigenschaft des Harns ist schon lange bekannt. Die entsprechenden Hemmsubstanzen wurden partiell gereinigt und als "Meningin" bezeichnet (3). Ihre Auscheidung wurde von mehreren Autoren bei verschiedenen Erkrankungen untersucht, ohne daß eine Beziehung zu den säurestabilen Plasma-Inhibitoren hergestellt wurde. In neuerer Zeit wurden die Harn-Inhibitoren von Proksch und Mitarbeitern erneut untersucht. Dabei fiel die immunologische Kreuzreaktion mit dem ITI des Serums auf. Gleichzeitig ermittelten sie für den säurestabilen Harn-Inhibitor ein Molekulargewicht von 70.000 (19 - 21).
Diese Ergebnisse standen jedoch im Widerspruch zu den Resultaten von Hochstrasser und Mitarbeitern: Sie isolierten aus deproteinisiertem und nativem Harn jeweils zwei säurestabile Inhibitoren, die zwar ebenfalls eine immunologische Kreuzreaktion mit dem ITI zeigten, deren Molekulargewicht (bestimmt mittels Gelfiltration) jedoch 22.000 und 44.000 betrug. Da diese beiden Hemmstoffe auch noch in ihrer Aminosäurezusammensetzung den Plasmainhibitoren gleichen, wurde angenommen,daß sie mit diesen identisch sind (13).
Ihre durchschnittliche Harnkonzentration liegt zwischen 8 und 10 ImU/ml mit Grenzwerten von 3 und 25 ImU/ml. Die Tagesauscheidung schwankt zwar erheblich zwischen 4.000 und 22.000 ImU, weist je-

doch bei 10.000 ImU pro Tag ein Häufigkeitsmaximum auf (13).
Bei verschiedenen Nephropathien, insbesondere der akuten Pyelonephritis, tritt eine massive Erhöhung der Inhibitorwerte im Harn auf. Dieser Befund führt erwartungsgemäß zu einem starken Anstieg der Inhibitor-Tagesausscheidung (4).

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I. Der säurestabile Proteasen-Inhibitor des Serums und des Harns mit dem Molekulargewicht 34.000 (I 34)

1) Untersuchungen und Ergebnisse

Die in diesem Kapitel beschriebenen Untersuchungen basieren auf der Fragestellung, ob der mittels Affinitätschromatographie aus nativem und enteiweißtem Harn und Serum isolierte säurestabile Inhibitor (kurz I 17), dessen molekularsiebchrometographisch bestimmtes Molgewicht 22.000 beträgt, mit dem im physiologischen Milieu vorkommenden, säurestabilen Proteasen-Hemmstoff des Harns und Serums identisch ist.
Aus diesem Grunde unterwarfen wir natives und auch deproteinisiertes Serum von Nierenpatienten direkt der einfachen Gelfiltration auf Sephadex G 200. Da bei Personen mit Nierenerkrankungen die Inhibitorkonzentration im Serum hohe Werte erreicht, bestand die Aussicht, Inhibitoren im Eluat nachweisen zu können.
Im Falle des deproteinisierten Serums stellten wir antiproteolytische Aktivität im Eluationsbereich von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 65.000 fest. Bei der Gelfiltration von nativem Serum ist dieser Inhibitor nur nach Enteiweißung aliquoter Proben bestimmbar (es muß nämlich eine Entfernung der übrigen, säurelabilen Inhibitoren erreicht

werden). Dabei fand sich säurestabile, antiproteolytische Aktivität an der gleichen Stelle im Eluat wie in der Gelfiltration des enteiweißten Serums. Dieser säurestabile Plasma-Trypsin-Inhibitor (kurz I 34) reagiert wie der I 17 mit Antikörpern gegen den Inter-Alpha-Trypsin-Inhibitor (ITI), seine elektrophoretische Beweglichkeit ist jedoch wesentlich größer als die des I 17. Der I 34 wandert etwa im Bereich des Präalbumins (Abb. 4).

Zur Untersuchung der Komplexierbarkeit fraktionierten wir angereicherten, mit Trypsin im Unterschuß versetzten I 34 über Sephadex G 150. Im Eluat fanden wir Komplexe mit Molekulargewichten von 90.000, indem wir den unveränderten Inhibitor durch Denaturierung des Trypsins freisetzten und im Trypsin-Hemmtest nachwiesen (Abb. 1). Diese Komplexe, offensichtlich aus einer äquimolaren Reaktion zwischen Trypsin und dem I 34 hervorgegangen, besitzen eine etwas geringere elektrophoretische Beweglichkeit als der freie Inhibitor (siehe Abb. 5).

Wird zur Komplexbildungddagegen überschüssiges Trypsin verwendet, so findet man im Eluat einen Komplex mit Molekulargewicht 46.000 (Abb. 2). Nach Deproteinisierung erhält man einen Inhibitor, dessen Molekulargewicht (bestimmt mittels Gelfiltration) 22.000 beträgt und der in seinen elektrophoretischen und immunologischen Eigenschaften dem I 17 entspricht (Abb. 5).

Zur Ergänzung dieser unerwarteten Befunde unterwarfen wir nativen, durch Druckdialyse eingeengten

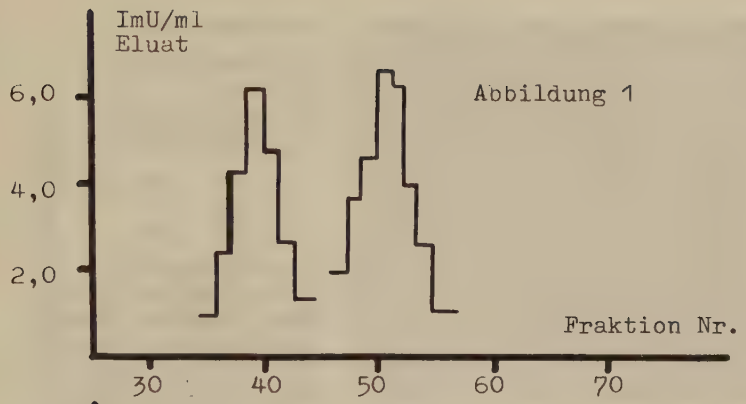
Sammelurin ebenfalls der Gelfiltration. Für den im nativen Harn enthaltenen Inhibitor ermittelten wir dasselbe Molekulargewicht wie beim I 34. Nicht nur die elektrophoretische Beweglichkeit, sondern auch das immunologische Verhalten waren gleichfalls mit dem I 34 identisch.
Bei der Umsetzung mit Trypsin wird ebenfalls ein Komplex mit Molekulargewicht 90.000 gebildet, und nach Inkubation mit Trypsin im Überschuß ist wiederum derselbe Inhibitor, wie er bei der Affinitätschromatographie von enteiweißtem Harn erhalten wird, zu finden.

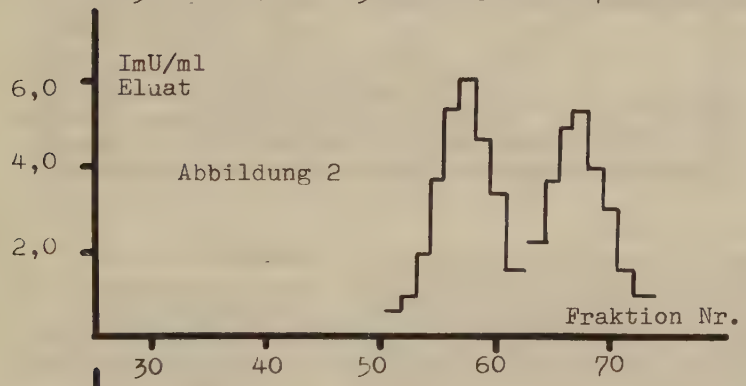
Abbildung 1

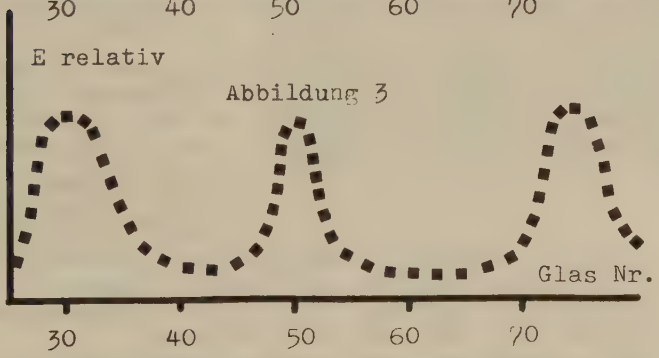
Fraktionierung von freiem und mit Trypsin komplexiertem I 34 auf Sephadex G 150 in 0,05 M Boratpuffer, pH 8,0. Antitryptische Wirkung findet sich nach Enteiweißung bei Fraktion Nr. 38, was einem Molekulargewicht von 90.000 entspricht (Eluation des Trypsin-I 34-Komplexes). Freier I 34 erscheint dagegen bei Glas Nr. 49 im Eluat.

Abbildung 2

Fraktionierung des mit Trypsin im Überschuß behandelten I 34 vor und nach Deproteinisierung auf Sephadex G 150 in 0,05 M Boratpuffer, pH 8,0. Der erste Gipfel der Stufenkurve bei Glas Nr. 57 (gemessen nach Enteiweißen) wird durch die Eluation des Trypsin-I 17-Komplexes bewirkt (Molekulargewicht 46.000). Freier I 17 findet sich bei Fraktion Nr. 68 (zweiter Gipfel).


ImU/ml
Eluat
6,0
4,0
2,0
Abbildung 1
Fraktion Nr.
30
40
50
60
70


ImU/ml
Eluat
6,0
4,0
2,0
Abbildung 2
Fraktion Nr.
30
40
50
60
70


E relativ
Abbildung 3
Glas Nr.
30
40
50
60
70

I II III

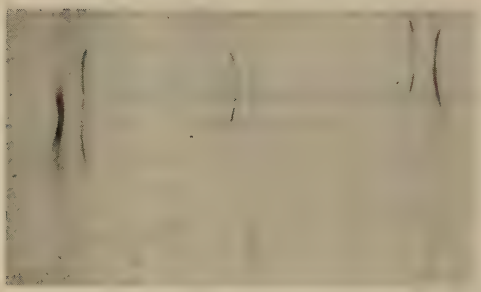
Abbildung 4

I: 5 µl Serum
+ 4 ImU I 17

II: 5 µl Serum
+ 4 ImU I 34

III: 5 µl Serum
+ 4 ImU I 17
+ 4 ImU I 34

Eindimensionale Immunelektrophorese: Links der Rinne wurden jeweils 5 µl Kontrollserum aufgetragen, rechts die säurestabilen Inhibitoren. Die Proteine wanderten von unten nach oben. Als Antikörper verwendeten wir Anti-ITI-Serum. Die elektrophoretische Beweglichkeit des I 34 ist größer als die des ITI, der wiederum schneller als der I 17 wandert.



I II III

Abbildung 5

Eindimensionale Immunelektrophorese: Wanderungsrichtung und Antikörper wie oben.

I: Links 5 µl Kontrollserum; rechts 4 ImU I 34 mit Trypsin im Unterschuß versetzt. Der Trypsin-I 34-Komplex wandert langsamer als der freie Inhibitor.
II: Links 4 ImU I 34; rechts 4 ImU I 34 mit Trypsin im Überschuß versetzt. Es entsteht Trypsin-I 17-Komplex, der langsamer und in die entgegengesetzte Richtung wie der freie I 17 wandert.
III: Links 4 ImU I 34; rechts 4 ImU I 34 nach Neuraminidasebehandlung. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist geringer als beim unveränderten Inhibitor.

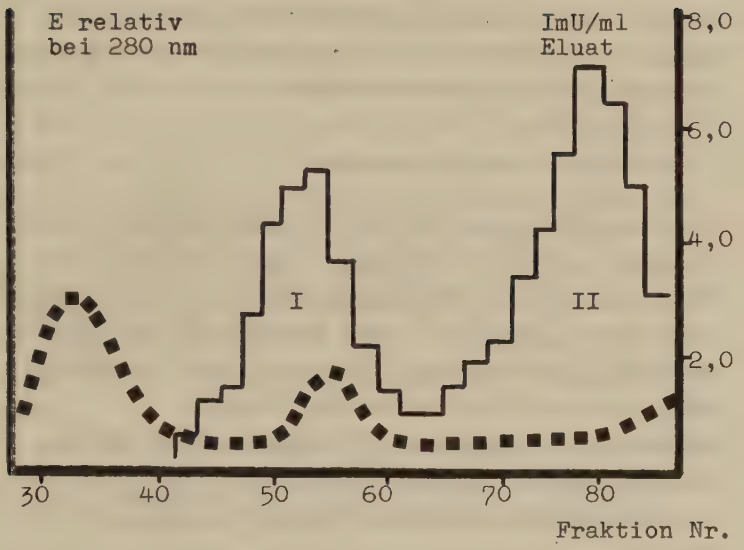


Abbildung 6

Fraktionierung von nativem und mit Trypsin im Überschuß behandeltem Harn an Sephadex G 100 in 4 M Harnstoff. Die Extinktionskurve ist eine übertragene Uvicordkurve, deren Maxima bei Fraktion Nr. 33 und 55 durch zur Calibrierung zugegebenes Dextranblau und Albumin bewirkt wurden. Die Stufenkurve gibt den Inhibitorgehalt der jeweiligen Fraktionen an. Der native Harninhibitor (I 34) erschien gleichzeitig mit dem Albumin im Eluat (Gipfel I der Stufenkurve). Der mit Trypsin behandelte Harninhibitor verursachte dagegen den Gipfel II bei Glas Nr. 78. Selbst in 4 M Harnstofflösung ist der I 34 stabil und zerfällt nicht in kleinere Inhibitormoleküle.

Abbildung 3

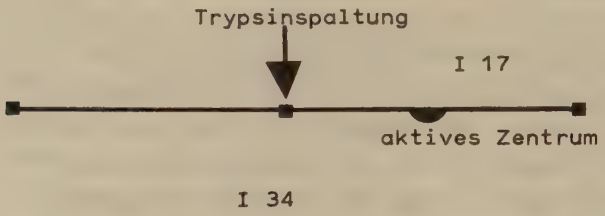
Zur Bestimmung obiger Molekulargewichte eichten wir die Säule (Sephadex G 150) mit Dextranblau, Albumin und Cytochrom C. Die Extinktionskurve lieferte uns der Uvicord-Schreiber.

2) Diskussion der Ergebnisse

Nach Abschluß dieser Untersuchungen wurde von Hochstrasser und Mitarbeitern der aus Serum und Harn isolierte I 34 durch Behandlung mit einem speziellen Trypsinharz gereinigt. Nach Entsalzung und Gefriertrocknung bestimmte man die spezifische Aktivität des Inhibitors: Sie betrug 0,7 ImU/µg.
Rechnerisch ermittelten wir dagegen 0,37 ImU/ug, wenn ein Molekulargewicht von 65.000 und eine äquimolare Hemmung angenommen wird ($\frac{24.000}{65.000}$ = 0,37 ImU/µg).
Diesen Widerspruch erklärten wir uns folgendermaßen: Als stark saures Protein mit einem hohen Kohlehydratanteil (siehe unten) besitzt der I 34 in wässriger Lösung eine Hydrathülle. Auf diese Weise wird sein Molekülradius vergrößert. Deshalb bestimmten wir mit der Gelfiltration ein zu hohes Molekulargewicht.
Im Gegensatz zum molekularsiebchromatographisch ermittelten Wert von 65.000 errechneten wir aus der gemessenen spezifischen Aktivität das wahre Molekulargewicht des I 34 : $\frac{24.000}{0,7}$ = 34.000.
Auch der I 17 täuscht als Glucoprotein bei der Molekularsiebchromatographie ein zu hohes Molekulargewicht vor: Der wahre Wert liegt etwa bei

17.000, wenn man eine spezifische Aktivität von 1,4 ImU/µg (gemessen nach Reinigung des Inhibitors mit Trypsinharz) zugrunde legt.
Offensichtlich wird physiologischerweise die säurestabile antiproteolytische Aktivität des Serums und Harns durch einen Inhibitor mit dem Molekulargewicht 34.000 (I 34) repräsentiert.
Da wir den I 17 molekularsiebchromatographisch nur nach Behandlung mit Trypsin im Überschuß nachweisen konnten und das Trypsin im Organismus lediglich innerhalb des Verdauungskanals aktiv ist, muß dieser Inhibitor als ein im physiologischen Milieu nicht vorkommendes Kunstprodukt angesehen werden.
Der I 34 scheint aufgrund seiner großen elektrophoretischen Beweglichkeit und seiner Säurestabilität einen hohen Kohlehydratanteil zu besitzen. Durch Neuraminidasebehandlung würde die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit bei unveränderter inhibitorischer Aktivität deutlich vermindert (Abb. 5).
Die durch Trypsin mögliche Abspaltung von etwa 60 % des Aminosäure- und Kohlehydratbestands unter Bildung von I 17 bewirkt keine Änderung der Hemmspezifität (siehe Hemmkonstanten in Kap. IV). Der resultierende Inhibitor ist jedoch relativ basisch, worauf seine geringe elektrophoretische Beweglichkeit zurückzuführen ist.
Der I 34 wird aber erst in Gegenwart von ungehemmtem (überschüssigem) Trypsin zu I 17 abgebaut. Dabei greift das Trypsin offensichtlich den

komplexierten Inhibitor an.
Durch reversible Adsorption an wasserunlösliches Trypsinharz wurde früher aus Plasma und Harn nur I 17 isoliert. Anscheinend ist selbst an Harz gebundenes Trypsin in der Lage, den I 34 in wechselnder Ausbeute in I 17 umzuwandeln.



Der I 34 bildet mit Trypsin Komplexe im Verhältnis von 1 : 1. Er besitzt also wie der I 17 nur ein aktives Zentrum mit derselben Hemmspezifität. Deshalb gelten bei der Untersuchung der Enzym-I17-Komplexe gewonnenen Ergebnisse ohne Einschränkung auch für den I 34 (Kap. III und IV).
Weiterhin läßt sich aussagen, daß der I 34 aus einer durchgehenden Peptidkette besteht. Sein Molekulargewicht ändert sich in 4 M Harnstoff-Lösung nicht. Würde der I 34 aus mehreren über Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehaltenen Peptidketten bestehen, so wäre in Gegenwart von Harnstoff sein Zerfall in eben diese Untereinheiten zu erwarten gewesen (siehe Abb. 6).

II. Der Inter-Alpha-Trypsin-Inhibitor (ITI) als "precursor" der säurestabilen Proteasen-Inhibitoren des menschlichen Serums und Harns

1) Fragestellung

Den immunologischen Untersuchungen nach zu schliessen, besteht offensichtlich ein Zusammenhang zwischen dem ITI einerseits und den säurestabilen Serum- bzw. Harn-Inhibitoren andererseits, deren Konzentrationen bei Patienten mit verschiedenen Nephropathien erhöht sind.
Hochstrasser und Mitarbeiter verglichen daher die ITI-Spiegel von Nierenerkrankten mit denen von Normalpatienten, wobei die Elektroimmundiffusion nach Laurell angewendet wurde: Währen in der ITI-Konzentration keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten, fiel sofort auf, daß bei Patienten mit hohen Inhibitor-Titern in jedem Fall Doppel- und Dreifachpräzipitate auftraten. Der zweite oder dritte Komplex oberhalb des ITI-Präzipitats konnte aber nicht den säurestabilen I 34 darstellen, da man nach Enteiweißen mit Perchlorsäure keine Präzipitate mehr fand.
Bei Nephropathien kommt es also neben dem Anstieg des I 34-Spiegels auch zur Konzentrationserhöhung eines weiteren, allerdings säurelabilen Derivats des ITI.
Wir nahmen nun an, daß der I 34 aufgrund proteolytischer Vorgänge aus dem ITI gebildet wird. Der Anstieg des Inhibitor-Titers läßt sich dann auf eine gesteigerte Proteolyse zurückführen.

Möglicherweise wird dabei der ITI enzymatisch in den I 34 und ein oder mehrere andere Bruchstücke gespalten, welche zusammen mit dem intakten ITI die oben erwähnten Mehrfachpräzipitate verursachen könnten.
Um diese Annahme zu prüfen, planten wir, sowohl die enzymatische Freilegung des I 34 und I 17 in vitro zu erreichen, als auch das im Serum von Nierenerkrankten nachweisbare Derivat des ITI zu isolieren und zu untersuchen.

2) Untersuchungen und Ergebnisse

a) Isolierung der Bruchstücke des ITI (ITI-Derivate)

Zu diesem Zweck franktionierten wir Sammelserum von Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen an Sephadex G 200: Abbildung 7 zeigt die Chromatographie von nativem Sammelserum auf Sephadex G 200. Im Eluat wurde immunologisch IgG, ITI, Albumin und Alpha-1-Antitrypsin festgestellt. Die jeweiligen Proteinkonzentrationen in den Fraktionen bestimmten wir mittels der Elektroimmundiffusion nach Laurell (siehe unter Materialien und Methoden). Der ITI in intakter Form fand sich kurz nach der Front im Eluationsbereich für Substanzen mit Molekulargewichten um 180.000. Daneben erschienen gleichzeitig mit dem IgG drei weitere Proteine im Eluat, welche eine Kreuzreaktion mit Antikörpern gegen den ITI zeigten. Da wir vermuteten, daß es sich um Bruchstücke des ITI handeln könnte, bezeichneten wir sie als ITI-Derivat 1, 2 und 3.

Abb. 7

Fraktionierung von 20 ml nativem Harnserum auf Sephadex G 200. Die Kurve ist ein übertragenes Uvicord-Diagramm. Die Eluationsgipfel der verschiedenen Proteine wurden elektrophoretisch bestimmt (Laurell-Technik).

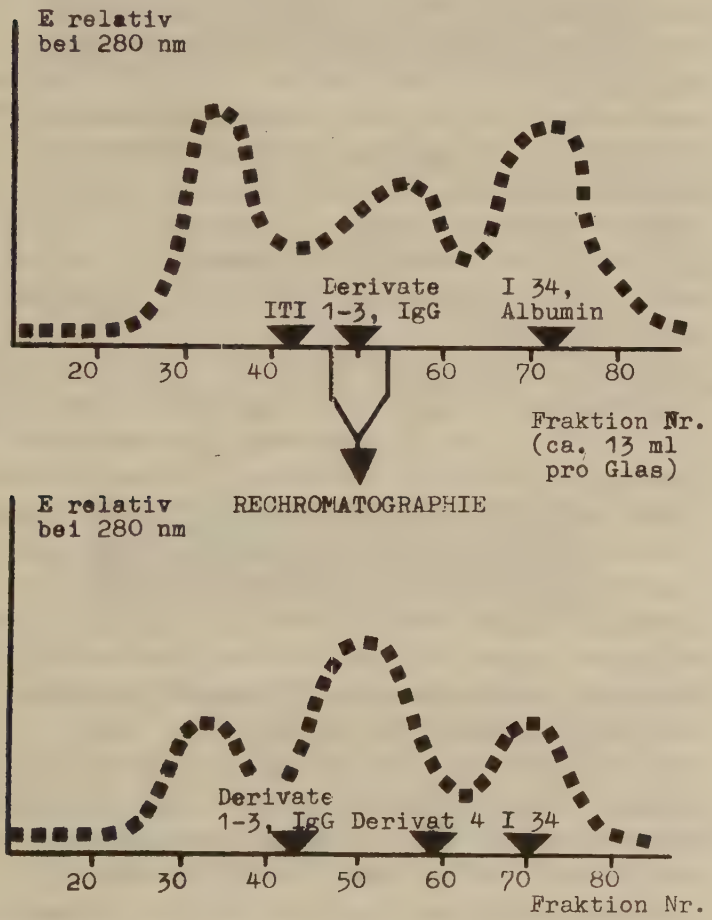


Abbildung 8

Rechromatographie der ITI-Derivate 1-3 auf Sephadex G 200.

Ihre Molekulargewichte waren nahezu gleich (ca. 160.000). Unterscheiden konnten wir sie nur anhand der elektrophoretischen Beweglichkeit (siehe Abb. 9). Auffallenderweise fehlte in ihrem Eluationsbereich intakter ITI.
Der Gipfel des I 34 ließ sich erst nach Anreicherung in der Elektroimmundiffusion nach Laurell nachweisen. Wie zu erwarten war, fiel das Eluationsmaximum des I 34 mit dem des Ablumins zusammen.

Im weiteren fanden sich an keiner Stelle des Eluats Substanzen, die ebenfalls eine Kreuzreaktion mit dem ITI zeigten.
Die Fraktionen, welche die ITI-Derivate 1, 2 und 3 enthielten, wurden vereinigt, dialysiert und gefriergetrocknet.
Wie soeben beschrieben, führten wir noch weitere Säulenläufe durch, um größere Mengen der ITI-Derivate 1, 2 und 3 zu isolieren. Die dabei gewonnenen Fraktionen an intaktem ITI wurden gleichfalls vereinigt, dialysiert und gefriergetrocknet.

Um nun einen höheren Reinheitsgrad zu erzielen, rechromatographierten wir die ITI-Derivate aus jeweils 5 Säulenläufen wiederum auf Sephadex G 200 im selben Puffer. Auch hier untersuchten wir anhand der Laurell-Technik den gesamten Eluationsbereich auf Bruchstücke des ITI.
Überraschenderweise fanden sich nur noch geringe Mengen der ITI-Derivate 1, 2 und 3 (Abb. 10). Dagegen konnten wir ein weiteres Bruchstück mit Molekulargewicht von etwa 110.000 (Derivat 4) erkennen. Selbst der I 34 ließ sich nun im Gegen-

Abbildung 9

Elektroimmundiffusion nach Laurell: Untersuchung von an Sephadex G 200 fraktioniertem Serum auf intakten ITI und ITI-Derivate (siehe auch Abbildung 7). Wanderungsrichtung von unten nach oben. Verwendete Antikörper: Anti-ITI-Serum. Aufgetragen wurden jeweils 10 µl des unbehandelten Eluats (Glas Nr. 36-52). Die Raketenhöhe gibt die relative Konzentration im Eluat an. Das Maximum des intakten ITI findet sich bei Fraktion Nr. 43. Die ITI-Derivate erscheinen dagegen bei Glas Nr. 49 (das am schnellsten wandernde Derivat ist auf der Fotographie schlecht erkennbar). Die Glockenkurve des ITI überlappt sich nicht mit denen seiner Derivate.

Abbildung 10

Elektroimmundiffusion wie oben: Untersuchung der auf Sephadex G 200 rechromatographierten ITI-Derivate 1 - 3 (siehe auch Abbildung 8). Es wurden jeweils 10 µl unbehandelten Eluats der Fraktionen Nr. 32 - 49 aufgetragen. Obwohl wir die ITI-Derivate 1 - 3 aus 5 Säulenläufen der Rechromatographie zugeführt hatten, erschienen nur noch geringe Mengen dieser Bruckstücke im Eluat. Ihr Maximum liegt etwa bei Glas Nr. 44.

satz zum ersten Lauf ohne Anreicherung elektrophoretisch darstellen, obwohl wir diesen Inhibitor der Rechromatographie nicht zugeführt hatten.

Anscheinend zerfielen die ITI-Derivate 1, 2 und 3 während der Dialyse nach der ersten Fraktionierung in das ITI-Derivat 4 und den I 34. Neben den Fraktionen mit den Derivaten 1-3 wurden nun auch die Gläser mit Derivat 4 und I 34 vereinigt, dialysiert und gefriergetrocknet. Leider war es uns dabei nicht möglich, das Derivat 4, vom I 34 abgetrennt, zu gewinnen, da sich die Eluationsbereiche dieser beiden Proteine sehr stark überlappen.

Zu Kontrollzwecken fraktionierten wir ebenfalls Frischserum gesunder Personen auf Sephadex G 200. Mittels der Laurell-Technik konnten wir im Eluat neben intaktem ITI auch die soeben bei Nierenpatienten festgestellten ITI-Derivate 1, 2 und 3 erkennen.

b) Untersuchung des gereinigten ITI

Zuerst wollten wir feststellen, ob es uns durch die einmalige Molekularsiebchromatographie gelungen war, das Inter-Alpha-Antitrypsin von den anderen Proteasen-Inhibitoren des Serums zu trennen. Dazu wurde die Immundiffusionstechnik nach Ouchterlony angewendet (siehe unter Materialien und Methoden): Wir konnten weder Alpha-1-Antitrypsin nach Alpha-1-Antichymotrypsin noch C-1-Inaktivator im lyophilisierten Material nachweisen.

Lediglich das Alpha-2-Makroglobulin war darin enthalten. Obwohl es sich dabei um einen Trypsin-Inhibitor handelt, nahmen wir an, im Trypsin-Hemmtest mit Sicherheit nur den ITI zu erfassen. Der Zutritt niedermolekularer Substrate zum aktiven Zentrum des Trypsins kann nämlich durch das Alpha-2-Makroglobulin nicht verhindert werden, d. h., die Trypsinaktivität, gemessen an der Spaltung von L-BAPA (siehe unter Materialien und Methoden), wird durch die Anwesenheit des Alpha-2-Makroglobulins nicht herabgesetzt.
Daraufhin erstellten wir im kinetischen Trypsin-Hemmtest die Hemmkurve des ITI(Abb. 11). Aus dieser Graphik berechneten wir die Inhibitorkonstante des ITI ($K = 1{,}61 \times 10^{-7}$ Mol/l) und die Hemmaktivität/mg Lyophilisat (7,1 ImU/mg).
Uns stellte sich die Frage, in welchem Verhältnis der ITI Trypsin zu hemmen vermag, d. h., wieviel Moleküle Trypsin ein Molekül ITI inaktivieren kann. Nimmt man eine Hemmung im Verhältnis von 1 : 1 an, so errechnet sich für den ITI bei einem Molekulargewicht von 180.000 eine spezifische Aktivität von $\frac{24.000}{180.000} = 0{,}13$ ImU/µg. Bei einer 2 : 1-Hemmung würde sich dagegen ein Wert von 0,26 ImU/µg ergeben. Dazu führten wir die Elektroimmundiffusion nach Laurell mit steigenden Mengen des von uns isolierten ITI durch. Die Abhängigkeit der Höhe der zungenförmigen Präzipitate von der eingesetzten Menge an ITI in ug ist in Abb. 12 dargestellt. Wir legten dabei sowohl eine Hemmung im Verhältnis von 1 : 1 als auch von 2 : 1 zugrunde und konnten deshalb

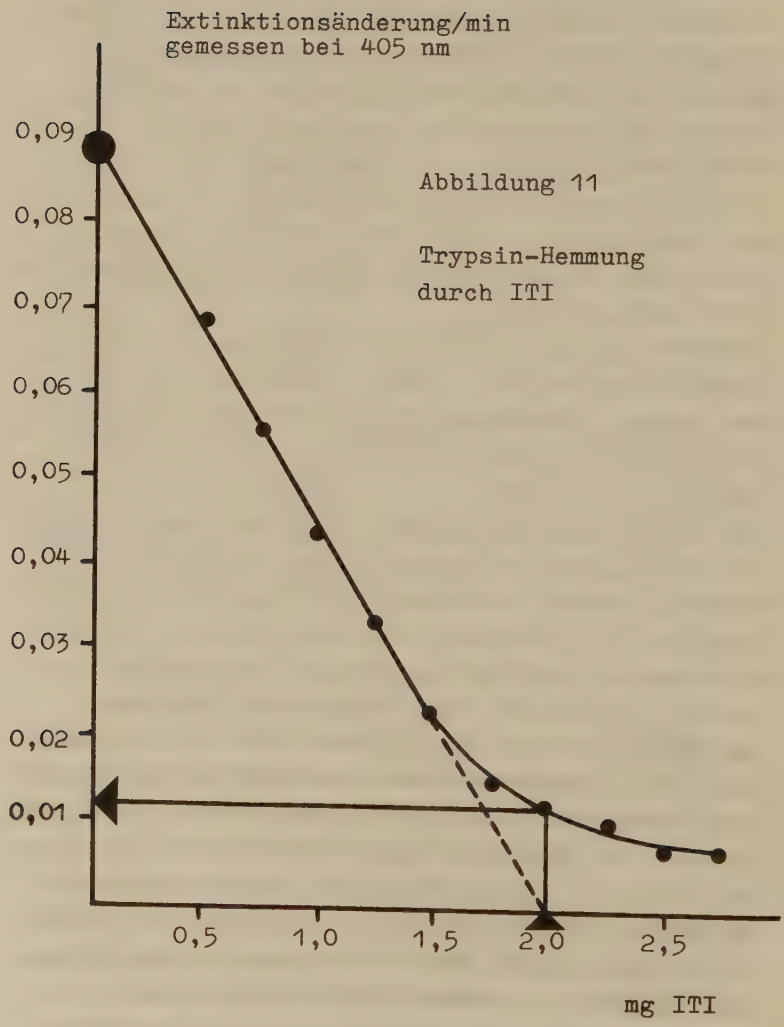


Abbildung 11

Trypsin-Hemmung
durch ITI

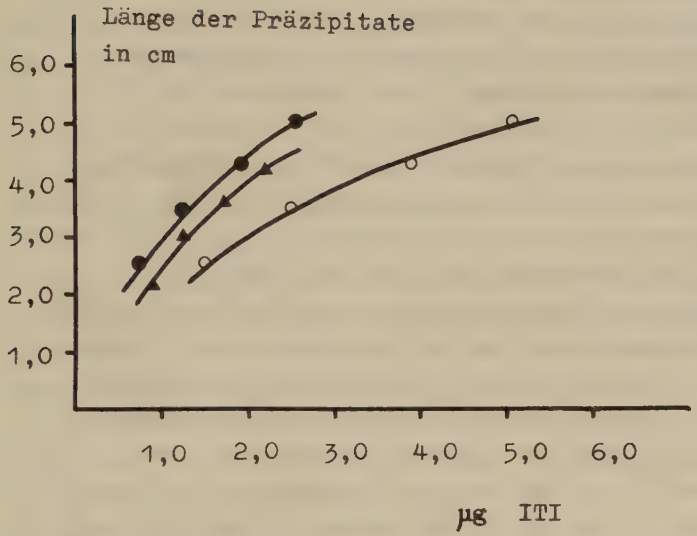


Abbildung 12

Elektroimmundiffusion des ITI
(nach Laurell)

▲▲▲ Standard-Serum

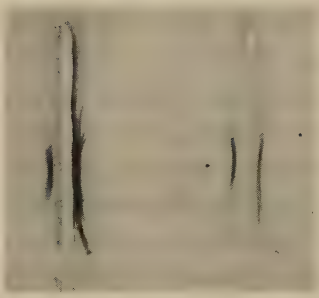
●●● isolierter ITI bei einer Trypsin-Hemmung im Verhältnis von 2:1

○○○ isolierter ITI bei einer Trypsin-Hemmung im Verhältnis von 1:1

zwei Kurven mit verschiedenen Steigungen zeichnen, da es zwei Möglichkeiten gab, die eingesetzten Hemmaktivität (ImU) in µg umzurechnen (siehe oben). Gleichzeitig stellten wir mit standardisiertem Serum der Behringwerke (ITI-Konzentration: 45 mg %) eine Eichkurve auf.
In Abb. 12 ist ersichtlich, daß sich Eich- und Meßkurve nur unter der Annahme einer Hemmung im Verhältnis von 2 : 1 decken. Der ITI scheint also zwei aktive Zentren zu besitzen.
Wir versuchten nun, in vitro die enzymatische Freilegung eines säurestabilen Inhibitors aus dem ITI zu erreichen, da wir vermuteten, daß die physiologischerweise im Serum und im Urin vorkommenden säurestabilen Inhibitoren aufgrund proteolytischer Vorgänge aus dem ITI gebildet werden.
An Stelle der anfangs noch unbekannten Protease, die im Serum oder in der Niere zur Wirkung kommt, verwendeten wir Trypsin. Als ITI-Quelle diente uns das aus Nierenpatientenserum isolierte Inter-Alpha-Antitrypsin. Da dort Alpha-2-Makroglobulin die Wirkung von Trypsin blockiert, mußten wir Trypsin bis zur Erschöpfung des Inhibitorpools und zum Auftreten tryptischer Aktivität in den Ansätzen zufügen. Die Ansätze wurden 10, 20 und 60 Minuten bei 37° inkubiert und anschließend enteiweißt. In den neutralisierten Überständen fanden wir antiproteolytische Aktivität vor.
Durch die Trypsineinwirkung auf den ITI wird offensichtlich ein säurestabiler Inhibitor freigesetzt. Die freilegbare Inhibitormenge ändert sich nicht

bei Verlängerung der Inkubationszeit oder bei Erhöhung der Trypsinkonzentration.
Zur Charakterisierung wurde die durch Trypsin aktivierbare antiproteolytische Aktivität angereichert und der Gelfiltration auf Sephadex G 100 unterworfen. Wir ermittelten anhand der Gelfiltration ein Molekulargewicht von 22.000 wie für den von uns aus enteiweißtem Plasma mittels Affinitätschromatographie isolierten Inhibitor. Der durch Trypsin freisetzbare Inhibitor zeigt in der Immunelektrophorese mit Antikörpern gegen ITI ebenfalls eine Kreuzreaktion. Seine elektrophoretische Beweglichkeit gleicht der des früher durch Affinitätschromatographie isolierten Inhibitors.
In den Inkubationsansätzen, in denen der freisetzbare Inhibitor gefunden wurde, ist immunologisch kein ITI mehr nachweisbar.
Da es sich bei dem durch Trypsineinwirkung aus dem ITI freilegbaren Inhibitor offensichtlich um I 17 handelte, fragten wir uns, welches Enzym in vivo die Freilegung des I 34 aus dem ITI bewirkt. Wir dachten dabei zunächst an das Kallikrein, da der gesteigerte Serumspiegel des I 34 bei bestimmten Nephropathien mit einer verminderten Aktivität des Harn-Kallikreins einhergeht (31).

0,6 mg gefriergetrocknetes Pankreas-Kallikrein vom Schwein wurde zusammen mit 2,4 mg (= 17,04 I.E.) des zuvor gereinigten und lyophilisierten ITI in 30 µl 0,2 Triäthanolyminpuffer, pH 7,8, gelöst. Diesen Ansatz inkubierten wir bei 37°, und entnahmen nach 15 Minuten und auch nach 10 Stunden



I II

Abbildung 13

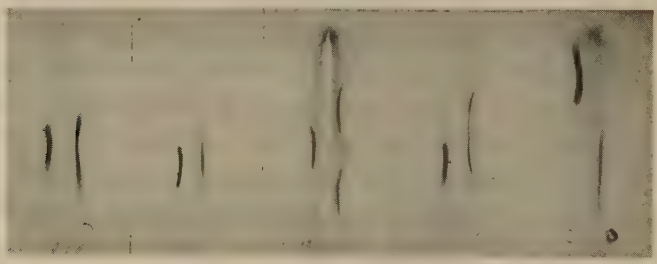
Eindimensionale Immunelektrophorese: Wanderungsrichtung von unten nach oben; verwendete Antikörper: Anti-ITI-Serum.

I: Links 5 µl Kontrollserum; rechts 15 min lang mit Kallikrein inkubierter ITI.

II: Links 5 µl Kontrollserum; rechts 10 Stunden lang mit Kallikrein inkubierter ITI.

Platte I zeigt rechts der Rinne neben intaktem ITI mehrere ITI-Derivate, während auf der Platte II nur noch Bruchstücke des ITI zu sehen sind: Das schnell wandernde Bruchstück ist vermutlich I 34; die beiden anderen Derivate besitzen dieselbe elektrophoretische Beweglichkeit wie das ITI-Derivat 4 (siehe unten).

Abbildung 14



I II III IV V

Eindimensionale Immunelektrophorese wie oben:

Links der Rinne: 5 µl Kontrollserum (Platte I-V)
Rechts der Rinne: Platte I: Intakter ITI.
Platte II: ITI-Derivat 1-3.
Platte III: I 34 + ITI-Derivat 4.
Platte IV: I 34 + ITI-Derivat 4 nach Säurefällung.
Platte V: 4 ImU BSI

jeweils 10 µl zur immunelektrophoretischen Untersuchung.
Abb. 13 zeigt, daß das Kallikrein den ITI in mehrere Bruchstücke spalten kann. Eines davon ist der hohen elektrophoretischen Beweglichkeit nach zu schließen vermutlich I 34. Zwei weitere Bruchstücke des ITI zeigten dieselbe Wanderungsgeschwindigkeit wie das molekularsiebchromatographisch isolierte Derivat 4 (Abb. 14).
Nachdem es uns gelungen war, die Abstammung der säurestabilen Plasma-Inhibitoren aus dem ITI zu beweisen, wollten wir wissen, wieviel Moleküle I 17 (34) aus einem Molekül ITI freigelegt werden können. Dazu inkubierten wir eine definierte Menge ITI-Lyophilisat wiederum zusammen mit Trypsin etwa 30 Minuten lang bei 37°. Nach Säurefällung wurde im Überstand die antiproteolytische Aktivität bestimmt: Wir stellten fest, daß das Trypsin aus einem mg ITI (7,1 ImU) ca. 3,1 ImU I 17 abgespaltet hatte, d. h., mit Trypsin ließen sich nur 44 % der antitryptischen Aktivität des ITI in den I 17 überführen. Dabei war es gleichgültig, ob wir nativen oder denaturierten ITI mit Trypsin behandelten.
Möglicherweise sind in einem Molekül ITI die Vorstufen zweier Proteasen-Inhibitoren enthalten, wobei das Trypsin nur einen der beiden Hemmstoffe, nämlich den I 17, freilegen kann.

c) Untersuchung der ITI-Derivate

Das Derivat 1, 2 und 3

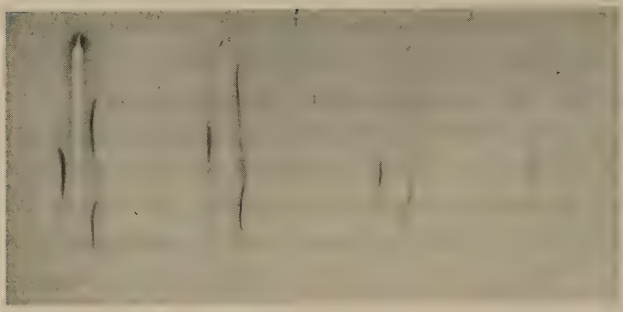
Zuerst prüften wir nach, ob es uns mit der Rechromatographie gelungen war, die ITI-Derivate 1, 2 und 3 von den anderen Proteasen-Inhibitoren des Plasmas zu reinigen. Wie beim intakten ITI bedienten wir uns der Immundiffusionstechnik nach Ouchterlony: Leider enthielt das lyophilisierte Material neben Alpha-2-Makroglobulin auch C-1-Inaktivator und Spuren des Alpha-1-Antitrypsins. Wir mußten also damit rechnen, im Trypsin-Hemmtest nicht nur die Wirkung der ITI-Derivate, sondern auch die des Alpha-1-Antitrypsins zu erfassen.
Uns interessierte nun, ob die ITI-Derivate 1, 2 und 3 überhaupt inhibitorisch aktiv sind, und ob aus ihnen durch Trypsinbehandlung ebenfalls I 17 freilegbar ist.
Dazu wurden 50 mg des Lyophilisats in 3 ml Triäthanolaminpuffer, pH 7,8, gelöst und davon 0,2 ml dem Trypsin—Hemmtest zugeführt. Die Hemmwirkung betrug 1,34 ImU/mg.
Anschließend inkubierten wir 2 ml der Testlösung zusammen mit überschüssigem Trypsin 30 Minuten lang im Wasserbad bei 37°. Nach Deproteinisierung (Eiweißfällung mit 70 %iger Perchlorsäure) bestimmten wir im neutralisierten Überstand die Trypsin-hemmende Wirkung. Wir berechneten, daß das Trypsin aus einem mg des Lyophilisats (1,34 ImU) etwa 0,54 ImU I 17 freigelegt hatte. Mit Trypsin

ließ sich also nur 40 % der antiproteolytischen Aktivität der ITI-Derivate 1, 2 und 3 in I 17 umwandeln. Zuletzt verglichen wir anhand der eindimensionalen Immunelektrophorese den intakten ITI mit seinen Derivaten 1, 2 und 3: Abb. 14 zeigt, daß die Derivate dieselbe Wanderungsgeschwindigkeit besitzen wie das Inter-Alpha-Antitrypsin. Lediglich ihre Präzipitationslinie ist unschärfer, wahrscheinlich weil es sich im Gegensatz zum ITI um ein Gemisch mehrerer Substanzen handelt.

Das ITI-Derivat 4

Wir hatten das Derivat 4 zusammen mit I 17 bei der Rechromatographie der ITI-Derivate 1, 2 und 3 gewonnen. Da es eine Kreuzreaktion mit Antikörpern gegen das Inter-Alpha-Antitrypsin zeigte, vermuteten wir, daß es sich um ein Bruchstück des ITI handeln könnte.
Zuerst untersuchten wir das damals gefriergetrocknete Material in der eindimensionalen Immunelektrophorese: Abb. 14 zeigt, daß das Derivat 4 langsamer wanderte als der gleichzeitig erkennbare I 34 und deshalb schon in Höhe des Kontrollserums präzipitierte. Wir führten die Elektrophorese auch nach Säurefällung durch und konnten nur noch I 34 nachweisen. Das Derivat 4 ist also wie auch der ITI ein säurelabiles Protein.
Wir fragten uns nun, ob das Trypsin in der Lage ist, nach aus dem Derivat 4 einen säurestabilen Proteasen-Inhibitor freizulegen. Dazu inkubierten

Abbildung 15



I II III IV

Eindimensionale Immunelektrophorese: Wanderungsrichtung von unten nach oben; verwendete Antikörper: Anti-ITI-Serum. Links der Rinne wurden jeweils 5 µl Kontrollserum aufgetragen.

Platte I:	Rechts I 34 + ITI-Derivat 4
Platte II-IV:	Rechts I 34 + ITI-Derivat 4 mit steigenden Mengen Trypsin versetzt.

Durch den Trypsinzusatz wird der I 34 in den langsamer wandernden Trypsin-I 34-Komplex übergeführt. Tritt freies Trypsin auf, so wird Trypsin-I 17-Komplex gebildet und das ITI-Derivat 4 abgebaut (Platte IV).

wir das in Triathanolaminpuffer, pH 7,8, gelöste Lyophilisat zusammen mit Trypsin wiederum etwa 30 Minuten lang bei 37°. Nach Enteiweißung bestimmten wir die inhibitorische Wirkung im Überstand. Den Wert verglichen wir mit der säurestabilen antiproteolytischen Aktivität vor der Inkubation und konnten keine Erhöhung der Hemmwirkung feststellen.
Dieses Ergebnis erhärtete unsere Vermutung, daß nämlich die Derivate 1, 2 und 3 in den I 34 und das ITI-Derivat 4 gespalten wurden, und sich deshalb, zumindest mit Trypsin, aus dem Derivat 4 kein säurestabiler Inhibitor mehr freilegen ließ.

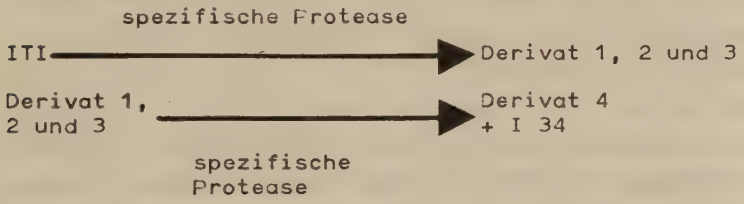
Leider konnten wir das ITI-Derivat 4 nicht direkt im Trypsin-Hemmtest auf antiproteolytische Wirkung hin untersuchen, da unser isoliertes Material mit I 34 und auch mit Alpha-1-Antitrypsin verunreinigt war. Deshalb entschlossen wir uns, das Derivat 4 nach Trypsinbehandlung der eindimensionalen Immunelektrophorese zu unterwerfen, um möglicherweise eine Trypsin-Hemmung durch den Nachweis von Trypsin-Derivat 4-Komplexen belegen zu können.
Es wurden 30 mg des Lyophilisats in 1 ml Triäthanolaminpuffer, pH 7,8, gelöst. Davon versetzten wir mehrere Ansätze (jeweils 10 µl) mit steigenden Mengen Trypsin. Da sowohl der I 34 als auch das Alpha-1-Antitrypsin die Wirkung des Trypsins blockierten, mußten wir Trypsin bis zur Erschöpfung des Inhibitorpools und zum Auftreten tryptischer Aktivität in den Ansätzen zufügen.

Die Ansätze wurden 30 Minuten lang bei 37° inkubiert und dann elektrophoretisch untersucht (Abb. 15). In den Ansätzen mit nur teilweise durch Trypsin inaktivierten Serum-Inhibitoren fanden wir das Derivat 4 unverändert vor. Trat dagegen freie tryptische Aktivität auf, erkennbar daran, daß der I 34 in den langsamer wandernden I 17 übergeführt wurde, verschwand das ITI-Derivat 4.
Wahrscheinlich bildet es, im Gegensatz zum I 34, mit Trypsin keinen Komplex, der sich anhand seiner elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit vom freien Inhibitor unterscheiden läßt. Mit Sicherheit können wir aussagen, daß das Derivat 4 durch freies Trypsin abgebaut wird.

3) Diskussion der Ergebnisse

Der ITI ist eines der am schwierigsten in nativer Form zu isolierenden Serumproteine. In Seren, die einige Zeit gestanden haben, findet man in der immunelektrophoretischen Untersuchung bereits mehrere Präzipitate.
Wird das Serum von Nierenpatienten und auch von Normalpersonen der Molekularsiebchromatographie unterworfen, so ist es möglich,kurz nach der Eluation des Inter-Alpha-Antitrypsins drei Bruchstücke dieses Inhibitors nachzuweisen. Ihr Molekulargewicht liegt etwa um 20.000 unter dem der nativen Hemmsubstanz. Erwartungsgemäß müßte sich der Eluationsbereich des ITI mit dem seiner Derivate 1, 2 und 3 überlappen.
Diese fehlen aber in den Fraktionen mit dem unveränderten ITI. Auch findet sich in den Gläsern, welche die Bruchstücke enthalten, kein intakter Inhibitor.

Wahrscheinlich kommt im Serum ein spezifisches, ITI-spaltendes-Enzym vor. Offenbar ist das Molekulargewicht dieser Protease zwar sehr viel kleiner als das des ITI; dennoch wird sie bei der Chromatographie nicht vollständig vom Inter-Alpha-Antitrypsin abgetrennt, so daß der hintere Teil der Gauß'schen Glockenkurve des ITI in die Derivate 1, 2 und 3 übergeführt wird.
Natürlich ist die ITI-spaltende Protease weiter vorhanden und aktiv, wenn man die Fraktionen mit den Bruchstücken vereinigt und dialysiert: Nun führt sie die Derivate 1, 2 und 3 in den I 34 und das Derivat 4 über, weshalb bei der Rechromatographie nur noch kleine Mengen der Derivate 1, 2 und 3 nachzuweisen sind, zusätzlich aber I 34 und Derivat 4 auftreten.

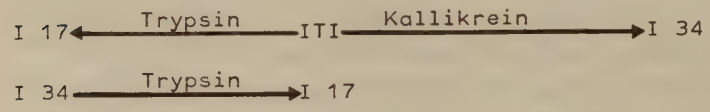


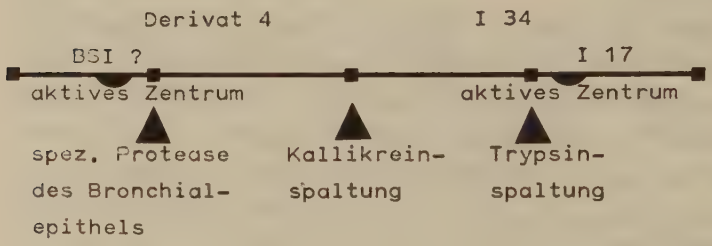
Bei der Umwandlung des ITI in seine Derivate 1, 2 und 3 werden offensichtlich nur kleine, aber verschiedene Teile seines Aminosäure- und Kohlehydratbestandes abgespalten, wodurch sich die unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit der Bruchstücke erklärt.
Da ein Molekül ITI zwei Moleküle Trypsin zu binden vermag, muß das intakte Inter-Alpha-Antitrypsin zwei aktive Zentren besitzen. Wir vermuten daher,

daß es auch die Vorstufen zweier Proteasen-Inhibitoren enthält. Durch Trypsinbehandlung können wir aber nur einen dieser beiden Hemmstoffe, nämlich den I 17, freilegen,denn das Trypsin überführt lediglich 44 % der antiproteolytischen Aktivität des ITI in I 17.
Offensichtlich gilt dies ebenfalls für die ITI-Derivate 1, 2 und 3. Auch bei ihnen führt das Trypsin etwa 40 % der Hemmwirkung in den säurestabilen I 17 über. (Der Wert liegt um 4 % unter dem des ITI, da wir die Hemmkapazität der Derivate, aufgrund der Verunreinigung mit Alpha-1-Antitrypsin, zu hoch bestimmt hatten).
Wird das Inter-Alpha-Antitrypsin in seine Derivate 1, 2 und 3 umgewandelt, so kommt es anscheinend zu keinen wesentlichen Veränderungen des Inhibitormoleküls, das vermutlich nur in eine Form gebracht wird, welche die folgende Spaltung in Derivat 4 und I 34 ermöglicht.
Es ist durch Trypsinbehandlung nicht mehr möglich, aus dem ITI-Derivat 4 einen säurestabilen Proteasen-Inhibitor freizusetzen, da einerseits der I 17 bereits abgespalten wurde, andererseits aber die Vorstufe eines weiteren, möglicherweise auch säurestabilen Hemmstoffes zwar noch im Derivat 4 enthalten sein dürfte, wobei das Trypsin aber nicht in der Lage ist, die entsprechenden Peptidbindungen zu spalten, um jenen Inhibitor freizulegen.
Vermutlich handelt es sich dabei um den säurestabilen Bronchialsekret-Inhibitor (BSI), da dieser Hemmstoff, wie auch der I 34 und I 17, eine Kreuzreaktion mit Antikörpern gegen den ITI zeigt (Abb. 14).

Da der BSI nur im Bronchialsekret nachweisbar ist, benötigt man wahrscheinlich eine spezifische Protease des Bronchialepithels, um diesen Inhibitor aus dem ITI freilegen zu können.
Leider gelang es uns nicht, eine Trypsin-hemmende Wirkung des Derivats 4 durch den elektrophoretischen Nachweis entsprechender Komplexe aufzuzeigen. Vielleicht lassen sich Trypsin-Derivat 4-Komplexe in der eindimensionalen Immunelektrophorese nicht vom freien Inhibitor unterscheiden, oder das aktive Zentrum des Bruchstückes wurde durch die vorangegangene Abspaltung des I 34 allosterisch inaktiviert.
Dagegen konnten wir diejenige Protease, welche I 34 aus Inter-Alpha-Antitrypsin freisetzt, näher charakterisieren: Da es uns möglich war, den intakten ITI durch Pankreas-Kallikrein in I 34 und ein dem Derivat 4 ähnliches Bruchstück zu spalten, gehört dieses Enzym wahrscheinlich zu den Kallikreinen.
Kallikreine sind in einer Reihe von Organen und Sekreten nachgewiesen worden. So existiert neben dem Speichel-, dem Pankreas- und dem Harn-Kallikrein auch ein Serum-Kallikrein, das in Form eines inaktiven "precursors", des Präkallikreins, vorkommt. Allgemein wurden die Kallikreine bisher als hochspezifische Proteasen angesehen, die durch limitierte Proteolyse aus hochmolekularen Kininogenen die vasodilatatorisch wirkenden Kinine freisetzen. Aufgrund der vorgelegten Ergebnisse kommt den Kallikreinen eine weitere wesentliche physiologi-

sche Funktion zu, nämlich aus Inhibitogenen sezernierbare Inhibitoren durch limitierte Proteolyse freizulegen. So wird wohl der I 34 durch Kallikreine aus seinem "precursor", der als schon lang bekannter ITI identifiziert wurde, freigelegt. Physiologischerweise wird wohl das Serum- oder Nieren-Kallikrein diese Aufgabe innehaben.





SCHEMATISCHE DARSTELLUNG
DES ITI-MOLEKÜLS

Aufgrund unserer Erkenntnisse läßt sich der bei Nierenerkrankungen zu verzeichnende Anstieg der Konzentrationen des I 34 in Serum und Harn besser verstehen: Bei gesunden Personen führt eine relativ niedrige Spontanaktivität des Kallikreins (in der Niere?) zu einer permanenten Freisetzung von I 34 aus dem Inter-Alpha-Antitrypsin. Ausgeschieden wird der Inhibitor wohl über die Niere. Dafür spricht, daß er in unveränderter Form im Harn

nachweisbar ist,und daß eine eingeschränkte Nierenfunktion zu erhöhten Inhibitor-Titern im Serum führt. Da für Proteine kein aktiver tubulärer Sekretionsmechanismus bewiesen ist, kommt für den I 34 nur eine glomeruläre Filtration in Frage.

In den Glomeruli der Niere werden pro Minute 120 ml Primärharn gebildet. Wenn man von einer Tagesausscheidung von rund 10.000 ImU I 34 und einer Serumkonzentration von etwa 8 ImU/ml ausgeht, so würde dies einer Filtrationsrate von 0,5 bis 1 % entsprechen, falls eine tubuläre Rückresorption nicht erfolgt (pro Minute 120 ml Serum mit 8 ImU/ml filtriert = 960 ImU/min; in 24 Stunden = 1.380.000 ImU; 10.000 ImU = 0,7 %). Die Filtrationsrate wäre damit eben so groß wie die des Albumins (Molekulargewicht 65.000).
Danach sollte also entweder die glomeruläre Filtration nur in der Größenordnung von 1 % liegen, oder es sollte bei einer höheren Filtrationsrate tubulär eine erhebliche Rückresorption erfolgen. Das Albumin jedenfalls wird tubulär praktisch vollständig zurückresorbiert.
Aufgrund seines Molekulargewichts von 34.000 müßte der I 34 besser filtriert werden als das Albumin. Da er sich aber in wässriger Lösung mit einer Hydrathülle umgibt, entspricht sein Molekülradius dem des Albumins. Der I 34 liegt somit an der Grenze der glomerulären Ausscheidung.

Die Filtrierbarkeit eines Proteins hängt offenbar auch mit der Art der elektrischen Ladung des Moleküls zusammen. Dies konnte am Beispiel des basischen Rinderpankreas-Inhibitors vom Kunitz-

Typ (Trasylol ^{R}) gezeigt werden (34). Während der native Inhibitor im Tierversuch schlecht ausgeschieden wird, erfolgt nach Ladungsänderung durch Maleylierung (jedes Lysin-Kation wird in ein Anion übergeführt) eine rasche renale Ausscheidung, eine Rückresorption in den Tubuli tritt offenbar nicht ein. Der I 34 ist nach seinem elektrophoretischen Verhalten ein stark saures Protein. Man könnte daher annehmen, daß entsprechend den Verhältnissen beim Rinderpankreas-Inhibitor eine tubuläre Rückresorption nicht erfolgt.

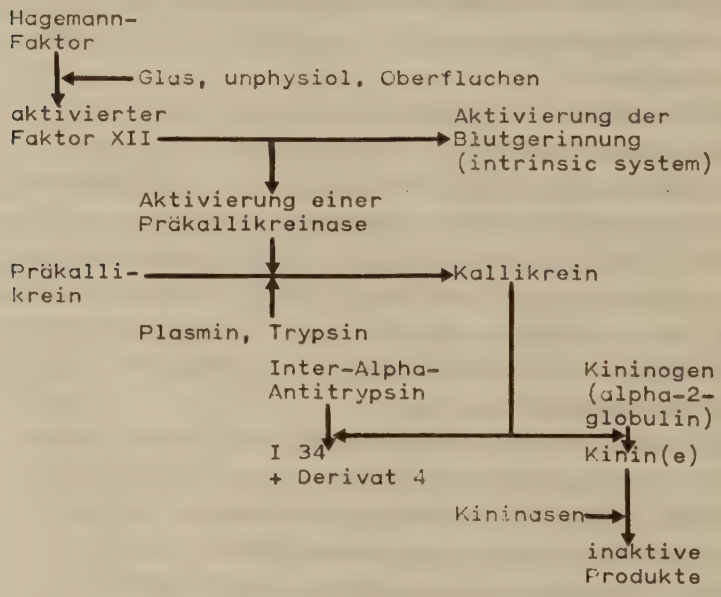
Wir kamen zu dem Ergebnis, daß aus einem Molekül ITI ein Molekül I 34 gebildet wird, d. h., aus einem µg ITI (Molekulargewicht 180.000) kann 0,21 µg I 34 freigesetzt werden. Die spezifische Aktivität des I 34 beträgt 0,7 ImU/µg, oder 1 ImU entspricht 1,5 µg (10.000 ImU I 34 = 15.000 µg I 34; 15.000 µg I 34 = 76 mg ITI). Eine Tagesausscheidung von 10.000 ImU I 34 würde also bedeuten, daß pro Tag mindestens 76 mg ITI unter Bildung von I 34 umgesetzt werden. Bei einem ITI-Gehalt von 500 mg pro l Serum und einem mittleren Plasmavolumen von 3 l bedeutet dies, daß täglich etwa 5 % des zirkulierenden ITI in abgebauter Form ausgeschieden werden.

Bei Nephropathien, die mit einer eingeschränkten Nierenfunktion einhergehen, sinkt das Glomerulumfiltrat ab. Als Folge davon muß die Konzentration des I 34 im Serum ansteigen; In der Tat haben entsprechende Untersuchungen ergeben, daß die Bestimmung des Serum-Inhibitor-Spiegels zuverlässig jede Einschränkung der glomerulären Funktion anzeigt (4). Die lineare Beziehung zum Kreatinin macht dies

deutlich.
Andererseits ist aber zu bedenken, daß erhöhte Serum-Konzentrationen an I 34 auch die Folge einer verstärkten Synthese sein könnten. Selbst eine massive Erhöhung der Inhibitorwerte im Harn bei der akuten Pyelonephritis führt aber zu keinem wesentlichen Anstieg der Serumkonzentration, wohl deswegen, weil bei diesem Krankheitsbild die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) noch im Normbereich liegt. Erst eine Verminderung der Nierenfunktion (Abnahme der GFR) läßt bei der chronischen Pyelonephritis den I34-Titer im Serum ansteigen (4).
Offenbar ist die Serumkonzentration des I 34 im wesentlichen von der GFR abhängig. Die Tagesausscheidung hingegen ist mit der Inhibitorproduktion korreliert:
Gefäßerweiterung, Erhöhung der Kapillarpermeabilität, Leukozytenmigration und Schmerz sind die Kardinalsymptome der Entzündung. Da diese Symptome den pharmakologischen Wirkungen der Kinine entsprechen, ist ihre Beteiligung an Entzündungsprozessen wahrscheinlich. Im Verlaufe einer Entzündung kommt es zur Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems und des Blutgerinnungssystems, die auf mehrfache Weise ineinandergreifen.
Die Niere enthält große Mengen einer Präkininogenase, vermutlich Präkallikrein. In den entbluteten Nieren von Hund, Schwein, Kaninchen und Ratte wurde nämlich eine Kininogenaseaktivität von 2 - 8 Kallikrein-Einheiten (KE) /g Gewebe nach Trypsinbehandlung gemessen (33). Bereits aktive Kininogenase war

dagegen nur in geringer Menge vorhanden (0,1 - 0,4 KE/g) (31).

Im Harn wird Kallikrein regelmäßig ausgeschieden, und zwar in aktiver Form (16). Die Konzentration im Harn unterliegt großen Schwankungen; sie beträgt bei gesunden Personen 0,15 ± 0,07 KE/ml. Das Harn-Kallikrein wird wahrscheinlich im proximalen Tubulus gebildet (32). Bei einer Schädigung der proximalen Tubuli nimmt die Ausscheidung ab. Entsprechend ist sie bei bestimmten Nierenerkrankungen wesentlich unter die Norm von 220 ± 100 KE/Tag abgefallen. Bei der Schrumpfniere wird sogar überhaupt kein Kallikrein mehr sezerniert.



Offenbar wird normalerweise in der Niere permanent aktives Kallikrein freigesetzt und über den Harn ausgeschieden. Vielleicht ist das Nieren-Kallikrein sogar an der Autoregulation der renalen Durchblutung als Antagonist des Renin-Angiotensin-Systems beteiligt.
Denkbar wäre auch eine Beeinflussung der Peristaltik der ableitenden Harnwege. Das Vorkommen einer Kininaktivität im Harn spricht dafür (15). Ihre Tagesausscheidung ist relativ konstand und liegt bei der Aktivität von 20-30 µg Bradykinin.
In Anbetracht der physiologischen Funktion des Nieren-Kallikreins müßte dieses Enzym in aktiver Form auch in den Nierengefäßen wirksam sein. Dies würde bedeuten, daß das die Niere durchströmende Blut einer Kallikreinaktivität ausgesetzt ist, wodurch es zu einer ständigen Freisetzung von I 34 aus dem ITI kommt. Gleichzeitig werden aus dem Alpha-2-Globulin permanent Kinine aktiviert (Vasodilatation, Regulation der Nierendurchblutung?) und über den Harn ausgeschieden (Stimulierung der Peristaltik der ableitenden Harnwege?)
Anscheinend können in der Niere entzündliche Reize den großen Präkallikreinpool dieses Organs in aktives Kallikrein umwandeln: Sowohl im Interstitium als auch intravasal steigt die Kallikreinaktivität an. Die daraufhin freigesetzten Kinine bestimmen die entzündliche Symptomatik. Gleichzeitig kommt es zu einer gesteigerten Bildung von I 34, dessen Serum-Konzentration aber bei noch intakter Nierenfunktion (GFR im Normbereich) nur wenig zunimmt.

Dafür imponiert die massive Erhöhung der Inhibitorwerte im Harn (4). Auf diese Weise ließe sich der Anstieg der Inhibitor-Tagesausscheidung bei Nierenerkrankungen mit vorwiegend akut-entzündlichem Charakter (akute und chronische Pyelonephritis, Abstoßungskrisen nach Transplantationen) erklären. Durch eine gesteigerte Inhibitor-Clearance bei Proteinurien (Zunahme der Eiweißpermeabilität der glomerulären Basalmembran) wird offenbar einem Anstieg der Inhibitor-Konzentration im Serum entgegengewirkt: Bei der akuten Glomerulonephritis kommt es trotz einer Abnahme des Glomerulumfiltrats um etwa 40 % zu keiner Erhöhung der Inhibitorkonzentration im Blut, wahrscheinlich deshalb, weil dieses Krankheitsbild mit einer Proteinurie einhergeht (4; 35).
Falls die Kinine in der Niere eine physiologische Aufgabe besitzen (Regulation der renalen Durchblutung?), so ist als Ursache einer gesteigerten Aktivität des Nieren-Kallikreins nicht nur ein entzündlicher Reiz zu diskutieren. Bei Nierenerkrankungen, die vorwiegend durch eine Funktionseinschränkung dieses Organs gekennzeichnet sind, mit Verminderung der glomerulären Filtrationsrate und der renalen Durchblutung, wäre auch eine kompensatorisch bedingte Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems denkbar. In der Tat findet man bei der chronischen Niereninsuffizienz und bei der chronisch interstitiellen Nephritis stark erhöhte Serum- und Harnkonzentrationen des I 34 (4).

Vermutlich ist in solchen Fällen eine Rentention des I 34 mit einer gesteigerten Synthese kombiniert.

Völlig unklar bleibt die physiologische Funktion des I 34. Zwar erscheint es sinnvoll, wenn bei entzündlichen Nierenprozessen der Inhibitorschutz in den ableitenden Harnwegen durch eine Zunahme des Inhibitor-Spiegels verstärkt wird. Ein direkter Nachweis, daß das inhibitorische System im Harn wirklich beansprucht wird, steht jedoch noch aus. Es gelang uns nicht, durch die Freilegung von maskiertem Inhibitor mittels Säurefällung Enzym-Inhibitor-Komplexe nachzuweisen. Möglicherweise sind die Komplexe im Harn instabil. Jedenfalls scheint die Hemmung leukozytärer Proteasen nicht die Aufgabe des I 34 zu sein, da diese Enzyme nicht in sein Hemmspektrum fallen. Vielleicht hemmt der I 34 die lysosomalen Proteasen (Kathepsine) abgeschilferter Harnwegsepithelien.

III. Untersuchung der Trypsin- und Chymotrypsin-Komplexe säurestabiler Inhibitoren des menschlichen Bronchialsekrets, des Serums und des Harns

1) Der Bronchialsekret-Inhibitor

a) Fragestellung und methodisches Vorgehen

Die glandula submandibularis des Hundes sezerniert einen polyvalenten Proteasen-Inhibitor, der zwei funktionell voneinander unabhängige Hemmzentren aufweist. Als bisher einziger sekretorischer Inhibitor kann er mit Proteasen ternäre Komplexe bilden. Dies bedeutet, daß beispielsweise ein binärer Trypsin-Inhibitor-Komplex noch Chymotrypsin anlagern und hemmen kann. Analog dazu hemmen Komplexe mit Chymotrypsin oder ähnlichen Enzymen Trypsin (14). Komplexe aus menschlichem BSI und Trypsin scheinen auf Chymotrypsin ebenfalls eine gewisse Hemmwirkung auszuüben. Uns stellte sich nun die Frage, ob dieses Phänomen auf der Bildung ternärer Komplexe beruht, was bedeuten würde, daß auch der menschliche Organismus in der Lage ist, säurestabile Proteasen-Inhibitoren mit mehreren Hemmzentren zu synthetisieren. Denkbar wäre aber auch, daß das Trypsin vom aktiven Zentrum des Inhibitors verdrängt wird. In diesem Fall müßte man lediglich ein intaktes Hemmzentrum im Inhibitormolekül annehmen.
Um die Hemmwirkung der Proteasen-Inhibitor-Komplexe quantitativ zu erfassen, mußten diese zuerst isoliert werden. Daraufhin konnten wir ihre Hemmaktivität mit der Hemmwirkung äquivalenter Mengen freien Inhibitors vergleichen.

b) Untersuchungen und Ergebnisse

Isolierung der Proteasen-BSI-Komplexe

Wie im theoretischen Teil bereits erwähnt, kommen im menschlichen Bronchialsekret neben freiem BSI natürliche Komplexe des BSI mit Leukozytenproteasen vor. Um nun komplexierten von freiem Inhibitor zu trennen, wurde lyophilisiertes Sammelsputum in 0,05 M Boratpuffer gelöst und auf Sephadex G 75 im selben Puffer fraktioniert. Leider konnten wir im Eluationsbereich der Komplexe nach Deproteinisierung nur eine geringe antiproteolytische Aktivität nachweisen.
Deshalb mußten wir künstliche Proteasen-BSI-Komplexe in ausreichender Menge herstellen: Etwa 10.000 ImU gereinigter BSI wurden mit 8.000 mU Trypsin versetzt, so daß die freie Hemmaktivität auf ca 20 % des ursprünglichen Wertes absank, d. h., 8.000 ImU BSI waren nun mit Trypsin komplexiert. Der eventuelle Abbau des gebundenen BSI durch ungehemmtes Trypsin ließ sich durch die Anwesenheit von freiem BSI verhindern.
Daraufhin trennten wir die Trypsin-BSI-Komplexe durch Fraktionierung auf Sephadex G 75 von ungebundenem BSI. Zur Prüfung auf maskierten Inhibitor wurden den eluierten Fraktionen aliquote Teile entnommen, mit 70 % Perchlorsäure versetzt (Endkonzentration 6 %), zentrifugiert und der Überstand mit 5 N NaOH genau neutralisiert.
Mit den so vorbereiteten Proben konnte dann im Trypsin-Hemmtest der Eluationsbereich der Komplexe

bestimmt werden. Bei der Säurefällung wird nämlich die Protease selektiv zerstört, wohingegen der säurestabile BSI freigesetzt und somit nachweisbar wird. Zur Messung der freien antiproteolytischen Aktivität im Eluat verwendeten wir natürlich unbehandelte Proben.
Das Maximum des komplexierten Inhibitors fand sich etwa bei Fraktion Nr. 45, während der freie BSI erst wesentlich später bei Fraktion Nr. 70 im Eluat erschien.
Als Molekulargewicht des Komplexes ergab sich ca. 38.000, woraus zu folgern war, daß es sich um binäre Komplexe handelte. (Die Säule wurde vorher mit Dextranblau, Albumin und Cytochrom C calibriert).
Die komplexhaltigen Fraktionen wurden vereinigt, dialysiert und gefriergetrocknet.
Entsprechend der soeben geschilderten Herstellung von Trypsin-BSI-Komplexen ließen sich auch Chymotrypsin-BSI-Komplexe isolieren. Dabei stellte sich heraus, daß der BSI mit Chymotrypsin ebenfalls binäre Komplexe (Molekulargewicht 37.000) bildet.

Untersuchung des Trypsin-BSI-Komplexes auf Chymotrypsin-Hemmung

Dazu lösten wir eine definierte Menge (25 mg) lyophilisierten Trypsin-BSI-Komplex in 5 ml aqua dest. Hiervon wurden 2 ml entnommen und enteiweißt. Die antiproteolytische Aktivität im Überstand betrug 50 IKE/ml, gemessen im kinetischen Trypsin-Hemmtest.
Nun stellten wir im kinetischen Chymotrypsin-Hemm-

test zwei Hemmkurven auf: Einmal wurden steigende Mengen Trypsin-BSI-Komplex eingesetzt, und zwar 0,05 bis 0,4 ml. Um die Hemmwirkung des Komplexes mit der Hemmaktivität des freien Inhibitors vergleichen zu können, führten wir den Chymotrypsin-Hemmtest auch mit enteiweißtem Komplex durch. Aus Abb. 16 ist ersichtlich, daß die Hemmwirkung des ungebundenen BSI etwa dreimal so stark ist wie die des Komplexes.

Untersuchung des Chymotrypsin-BSI-Komplexes auf Trypsin-Hemmung

In gleicher Weise wie oben erstellten wir nun zwei Hemmkurven, nur mit dem Unterschied, daß jetzt die Hemmaktivität des Chymotrypsin-BSI-Komplexes mit der des freien Inhibitors im Trypsin-Hemmtest verglichen wurde.
Wie Abb. 17 zeigt, ist der Chymotrypsin-BSI-Komplex kaum in der Lage, Trypsin zu hemmen.

Untersuchung der L-BAPA-Spaltung des Trypsin-BSI-Komplexes nach Zusatz von Chymotrypsin

Um festzustellen, ob die Hemmung des Chymotrypsins durch den Trypsin-BSI-Komplex auf einem Verdrängungsmechanismus beruht, versetzten wir jeweils 0,5 ml gelösten Trypsin-BSI-Komplex (60 ImU/ml BSI, gemessen im Trypsin-Hemmtest nach Enteiweißen) mit steigenden Volumina Chymotrypsin-Lösung (0,05 bis 0,4 ml), deren Aktivität 50 mU/ml betrug. Diese Testansätze wurden mit TRA-Puffer (siehe unter Materialien

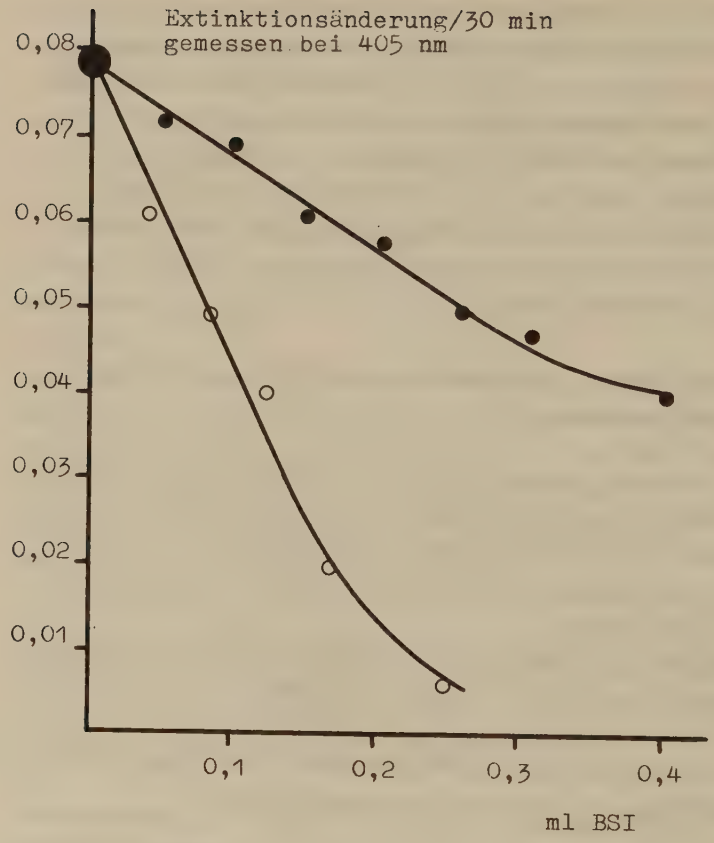


Abbildung 16

Chymotrypsin-Hemmtest

● mit Trypsin-BSI-Komplex

○ mit freiem BSI

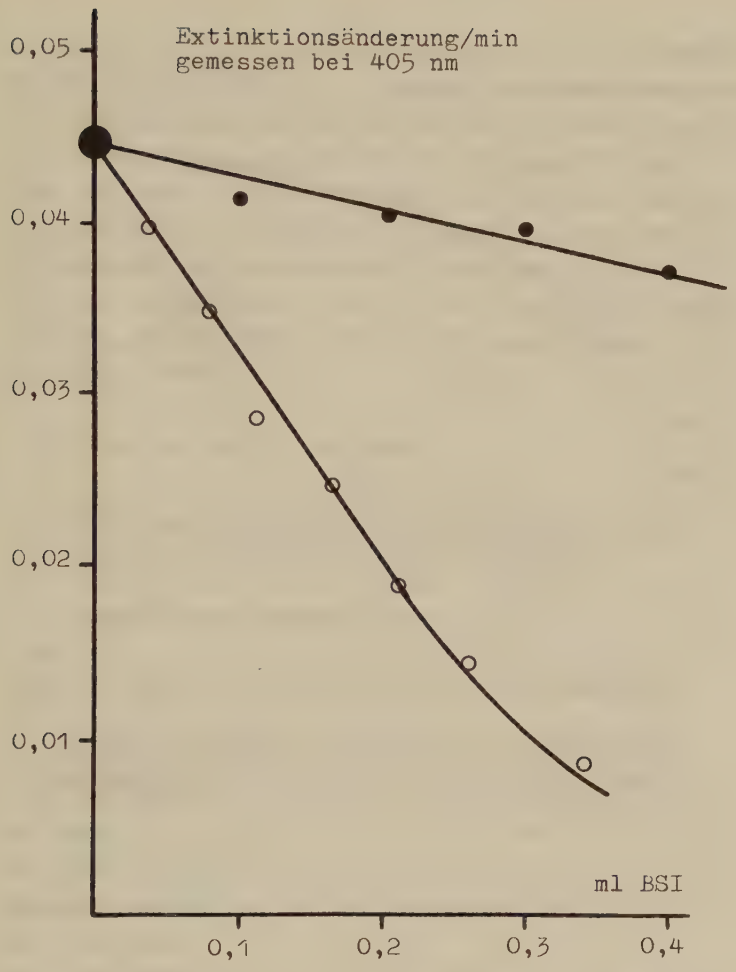


Abbildung 17

Trypsin-Hemmtest

● mit Chymotrypsin-BSI-Komplex
○ mit freiem BSI

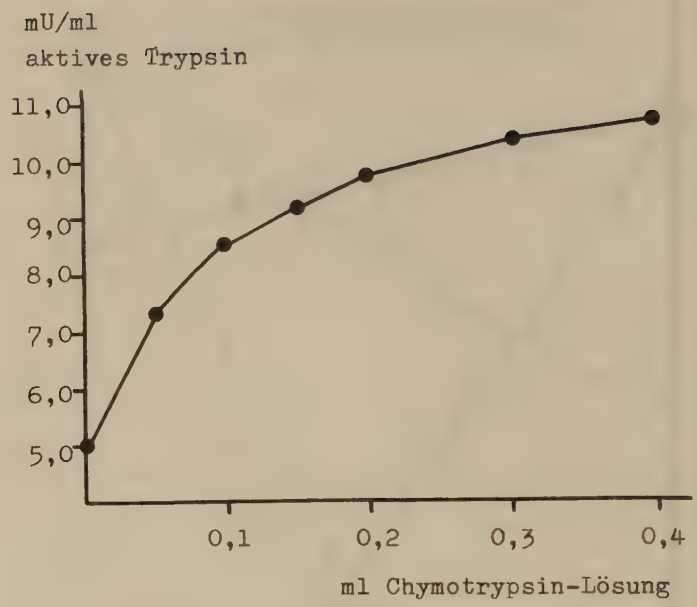


Abbildung 18

Freisetzung von Trypsin aus dem Trypsin--BSI-Komplex durch Zusatz von Chymotrypsin

und Methoden) auf 2 ml ergänzt und dann nach der Zugabe von jeweils 1 ml L-BAPA-Lösung die minütliche Extinktionsänderung bei 405 nm gemessen. Letztere ist proportional zur freien Trypsinaktivität. Abb. 18 zeigt die Abhängigkeit der freilegbaren Trypsinaktivität in mU/ml vom hinzupipettierten Volumen Chymotrypsin-Lösung. Ohne die Anwesenheit von Chymotrypsin betrug die Trypsinaktivität 5 mU/ml, sie konnte aber mittels Chymotrypsin auf 11 mU/ml erhöht werden.

c) Diskussion der Ergebnisse

Es besteht die Möglichkeit, die bisherigen Resultate auf das Vorhandensein zweier Hemmzentren in einem Molekül des BSI zurückzuführen. Ein aktives Zentrum wäre spezifisch für Chymotrypsin, das andere für Trypsin. Da nun aber Trypsin durch den binären Chymotrypsin-BSI-Komplex nicht gehemmt wird, müßte man eine allosterische Inaktivierung des Trypsin-spezifischen-Zentraums durch die Anlagerung des Chymotrypsins an den BSI postulieren. Im anderen Fall würde durch die Bindung des Trypsins das Chymotrypsin-spezifische-Zentrum nur teilweise gehemmt werden, so daß die Hemmaktivität auf etwa 30 % absinkt.
Wenn aber die Hemmung des Chymotrypsins tatsächlich durch Bildung ternärer Komplexe zustande käme, dürfte dabei kein Ansteigen der freien Trypsinaktivität nach Zusatz von Chymotrypsin zu verzeichnen sein (Abb. 18).

Wahrscheinlich bildet der BSI mit Chymotrypsin stabilere Komplexe als mit Trypsin. Aus diesem Grunde ist das Chymotrypsin in der Lage, Trypsin zumindest teilweise aus dem Komplex mit dem BSI zu verdrängen.
Dafür spricht auch, daß das Trypsin durch den Chymotrypsin-BSI-Komplex nicht gehemmt werden kann.
Der BSI besitzt also nur ein Hemmzentrum. Bei Anwesenheit mehrerer Proteasen kommt es zu einer Konkurrenz um das Hemmzentrum des BSI. Es stellt sich schließlich ein Gleichgewicht ein, wobei diejenige Protease bevorzugt angelagert wird, deren Komplexe mit dem BSI am stabilsten sind. Ein solches Enzym kann auch eine andere Protease aus einem bereits bestehenden, weniger beständigen Komplex verdrängen.
In Anbetracht der physiologischen Funktion des BSI wird verständlich, warum dieser Inhibitor mit Chymotrypsin eine besonders stabile Bindung eingeht: Er hemmt nämlich im oberen Respirationstrakt leukozytäre Proteasen, also chymotrypsinähnliche Enzyme.
Durch die Bestimmung der jeweiligen Hemmkonstanten versuchten wir, den soeben angenommenen Verdrängungsmechanismus zu erhärten (siehe Kap. IV).

2) Die Plasma-Trypsin-Inhibitoren
(I 34 und I 17)

a) Fragestellung und methodisches Vorgehen

Beide Inhibitoren hemmen Trypsin im Verhältnis von 1 : 1 (siehe Kap. I). So gingen wir im Unterschied zum BSI von der Anwesenheit eines Hemmzentrums pro

Inhibitormolekül aus, dessen Hemmspezifität wir untersuchen wollten.
Da der I 17 im Organismus offensichtlich nicht vorkommt und es bisher unmöglich war, natürliche Komplexe des I 34 nachzuweisen, mußten wir wie beim BSI künstliche Enzym-Inhibitor-Komplexe herstellen. Dazu sind aber größere Mengen an Inhibitor notwendig. Aus diesem Grunde konnten wir nur die Trypsin- und Chymotrypsin-Komplexe des I 17 durch Fraktionierung auf Sephadex G 150 isolieren, da zur Produktion der entsprechenden Enzym-I 34-Komplexe nicht genügend Inhibitor vorhanden war.

b) Untersuchungen und Ergebnisse

Bei der Säulenchromatographie bestimmten wir das Molekulargewicht der Enzym-I 17-Komplexe (siehe unten): Anscheinend reagiert der I 17 sowohl mit Trypsin als auch mit Chymotrypsin im Verhältnis von 1 : 1 (siehe auch Kap. I).

Untersuchung der Trypsin-I 17-Komplexe auf Chymotrypsin-Hemmung:

Aus Abb. 19 ist ersichtlich, daß der Trypsin-I 17-Komplex (Molekulargewicht 46.000) im Gegensatz zum freien I 17 kaum eine Hemmwirkung auf das Chymotrypsin ausübt.

Untersuchung der Chymotrypsin-I 17- Komplexe auf Trypsin-Hemmung:

Abb. 20 zeigt, wie die Hemmwirkung des Chymotrypsin-I 17-Komplexes (Molekulargewicht 45.000) auf Tryp-

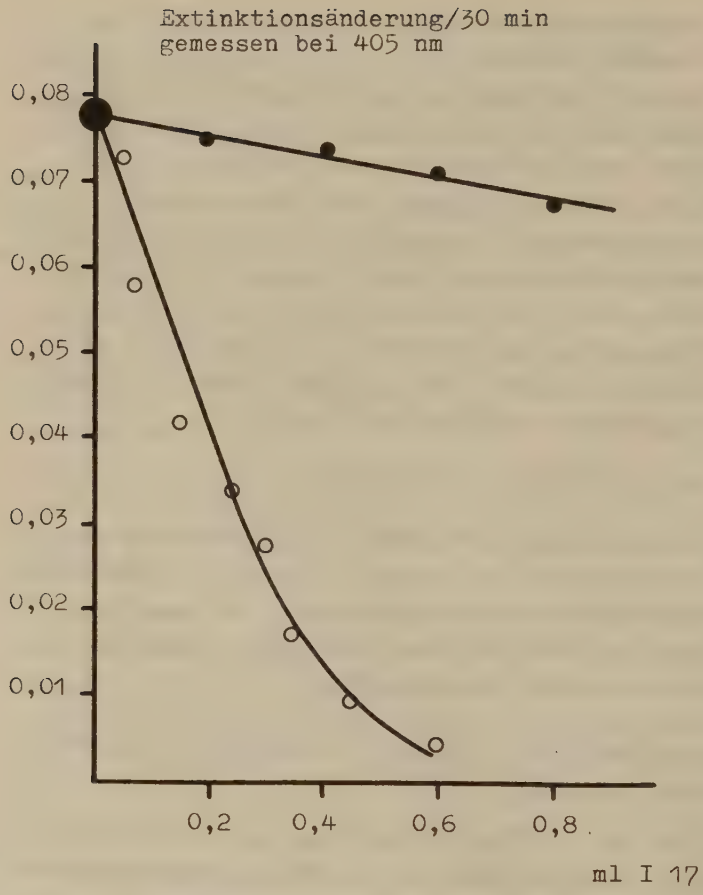


Abbildung 19

Chymotrypsin-Hemmtest

● mit Trypsin-I 17-Komplex

○ mit freiem I 17

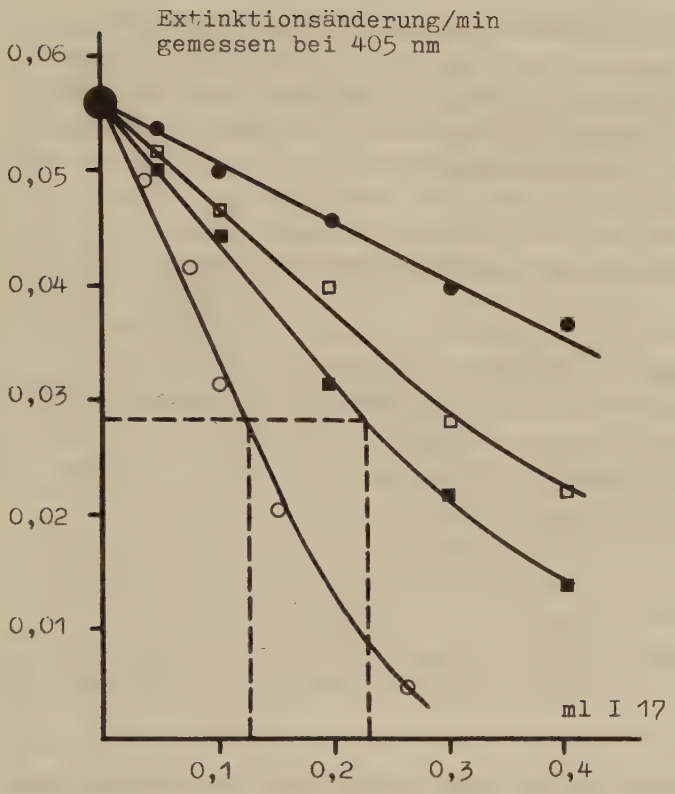


Abbildung 20

Trypsin-Hemmtest
mit Chymotrypsin-I 17-Komplex
● gemessen nach 8 min
□ gemessen nach 16 min
■ gemessen nach 24 min
ȯ mit freiem I 17

sin mit steigender Inkubationsdauer anwächst. Nach etwa 25 min erreichen die Komplexe 50 % der Hemmaktivität des freien Inhibitors. Weitere Messungen ergaben, daß ab diesem Zeitpunkt ihre Hemmwirkung konstant bleibt.

Untersuchung der BAPA-Spaltung des Trypsin-I 17-Komplexes nach Zusatz von Chymotrypsin:

Dazu wurde 1 ml gelöster Trypsin-I 17-Komplex (86 ImU/ml I 17, gemessen im Trypsin-Hemmtest nach Enteiweißen) mit 0,4 ml Chymotrypsin-Lösung (50 mU/ml) inkubiert. Wir verglichen nun die Trypsinaktivität dieser Inkubationslösung mit der einer aliquoten Menge unbehandelten Komplexes.
Dabei stellte sich heraus, daß das Chymotrypsin den freien Anteil des Trypsins lediglich von 1,7 % (1,5 mU/ml) auf 2,6 % (2,3 mU/ml) erhöhen konnte. Offensichtlich ist Chymotrypsin nicht in der Lage, Trypsin aus dem Komplex mit dem I 17 zu verdrängen.

Untersuchung der SUPHEPA-Spaltung (siehe unter Materialien und Methoden) des Chymotrypsin-I 17-Komplexes nach Zusatz von Trypsin:

2,66 ml Trypsin-Lösung (50 mU/ml) wurden mit 0,5 ml Chymotrypsin-I 17-Komplex (267 ImU/ml I 17, gemessen im Trypsin-Hemmtest nach Enteiweißen) inkubiert. Die Chymotrypsinaktivität dieser Lösung betrug 0,84 mU/ml, im Gegensatz zu 0,18 mU/ml einer unbehandelten, äquimolaren Komplex-Lösung.
Trypsin kann also aus dem Chymotrypsin-I 17-Komplex eine beträchtliche Menge des gebundenen Chymotrypsins freisetzen.

b) Diskussion der Ergebnisse

Zusammengefaßt erbrachten die Untersuchungen der Enzym-I 17-Komplexe folgende Resultate:
Chymotrypsin wurde durch den Trypsin-I 17-Komplex nicht gehemmt. Chymotrypsin war auch nicht in der Lage, Trypsin aus Komplexen mit dem I 17 freizusetzen, wodurch die fehlende Hemmung ihre Erklärung findet.
Trypsin dagegen bewirkt eine beträchtliche Freisetzung von komplexiertem Chymotrypsin, an dessen Stelle es sich mit dem Inhibitor verbindet. Somit wird verständlich, warum Trypsin relativ stark durch den Chymotrypsin-I 17-Komplex gehemmt wird.
Die Komplexe des I 17 entsprechen einer äquimolaren Reaktion, sind also binärer Natur.
Sämtliche Ergebnisse führen zu der Annahme, daß der I 17, genau wie der BSI, nur ein aktives Zentrum besitzen kann, an das aber bevorzugt Trypsin angelagert wird.
Dies wird im nächsten Kapitel anhand der Bestimmung der jeweiligen Hemmkonstanten geprüft.

IV. Bestimmung der Inhibitorkonstanten säurestabiler Proteasen-Inhibitoren des menschlichen Bronchialsekrets, des Serums und des Harns

1) Fragestellung

Die Inhibitorkonstante K_i stellt die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes dar (siehe Kapitel II im theoretischen Teil). K_i kann deshalb als ein Maß der Affinität zwischen einem Enzym und dessen Inhibitor angesehen werden.
Die in Kapitel III festgestellte Hemmwirkung komplexierter säurestabiler Inhibitoren machte einen Verdrängungsmechanismus wahrscheinlich: Eine Protease kann aus einem Enzym-Inhibitor-Komplex durch eine andere Protease verdrängt werden, sofern letzteres Enzym mit dem Inhibitor stabilere Komplexe bildet, deren Dissoziationskonstante K_i natürlich kleiner sein müßten als die eines weniger stabilen Komplexes.
Somit ist es möglich, den in Kapitel III postulierten Verdrängungsmechanismus durch die Bestimmung der entsprechenden Inhibitorkonstanten zu beweisen.

2) Methodisches Vorgehen

K_i ist folgendermaßen definiert:

$$K_i = \frac{e \times I}{EI} \quad \text{und} \quad E = e + EI \ , \quad \text{wobei}$$

E = Gesamtkonzentration des Enzyms in Mol/l

e = Konzentration des ungehemmten (freien) Enzyms in Mol/l

I = Konzentration des freien Inhibitors in Mol/l

EI = Konzentration des Komplexes aus Enzym und Inhibitor in Mol/l

Im Äquivalenzpunkt gilt nun:

$$E = I + EI \text{ , oder } e = I$$

Daraus ergibt sich:

$$K_i = \frac{e^2}{E - e}$$

E ist proportional zur Extinktionsänderung/min des Leerwertes. Durch Verländerung des geradlinigen Teils der Hemmkurve bis zur Abszisse erhält man die im Äquivalenzpunkt vorhandene Menge an Inhibitor. Die dieser Inhibitorkonzentration entsprechende Extinktionsänderung/min ist wiederum proportional zu e:

$$\frac{\text{Extinktionsänderung/min im Äquivalenzpunkt}}{\text{Extinktionsänderung/min des Leerwertes}} = \frac{e \text{ im Äquivalenzpunkt}}{E} = f$$

In $K_i = \frac{e^2}{E - e}$ eingesetzt erhält man:

$$K_i = \frac{f^2 \times E}{1 - f}$$

Zur Berechnung von K_i benötigt man also nur f und E. In Abbildung 21 - 26 ist ersichtlich, wie f graphisch ermittelt wurde. E erhielten wir folgendermaßen:

Berechnung der molaren Konzentration des Trypsins:

Extinktionsänderung/min des Leerwertes = 0,0066x eingesetzte Trypsinaktivität in mU (siehe unter Materialien und Methoden). Durch die Titration des aktiven Zentrums am Trypsin ist bekannt, daß 1 mU Trypsin ca. 35 mMol Trypsin ergibt. Entsprechend rechne-

ten wir die Trypsinaktivität von mU in Mol um.

Berechnung der molaren Konzentration des Chymotrypsins:

In jede Küvette setzten wir 20 µg TLCK-Chymotrypsin ein. Die Titration des aktiven Zentrums am Chymotrypsin ermöglichte uns die Umrechnung in Mol:

20 µg sind etwa 39 mMol gleichzusetzen.

3) Ergebnisse und deren Diskussion

a) Der Bronchialsekret-Inhibitor

Für K ergaben sich folgende Werte:

$K = 10{,}10 \times 10^{-9}$ Mol/l (Trypsin-Hemmung)

$K = 6{,}01 \times 10^{-9}$ Mol/l (Chymotrypsin-Hemmung)

$$\frac{K \text{ des Trypsin-Komplexes}}{K \text{ des Chymotrypsin-Komplexes}} = 1{,}67$$

Wie zu erwarten war, ist die Dissoziationskonstante des Chymotrypsin-Komplexes kleiner als die des Trypsin-Komplexes. Damit findet die Chymotrypsin-Hemmung des Trypsin-BSI-Komplexes ihre Erklärung. Allerdings ist der Größenunterschied der beiden Inhibitorkonstanten nicht so ausgeprägt wie bei den Plasma-Inhibitoren (siehe unten).

Dies steht im Einklang mit der Tatsache, daß die Chymotrypsin-Hemmung des Trypsin-BSI-Komplexes zwar zweifelsohne nachweisbar, aber doch relativ schwach ist. Sie beträgt nur etwa 30 % der Hemmaktivität des freien Inhibitors, da das Chymotrypsin lediglich $\frac{1}{3}$ des komplexierten Trypsins freisetzen kann.

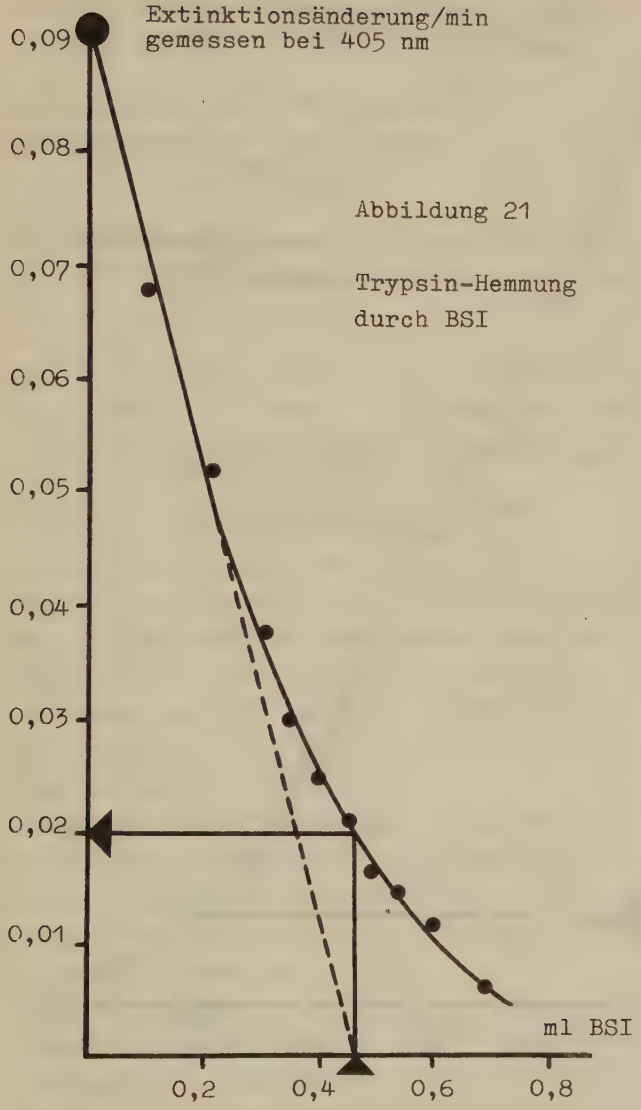


Abbildung 21

Trypsin-Hemmung
durch BSI

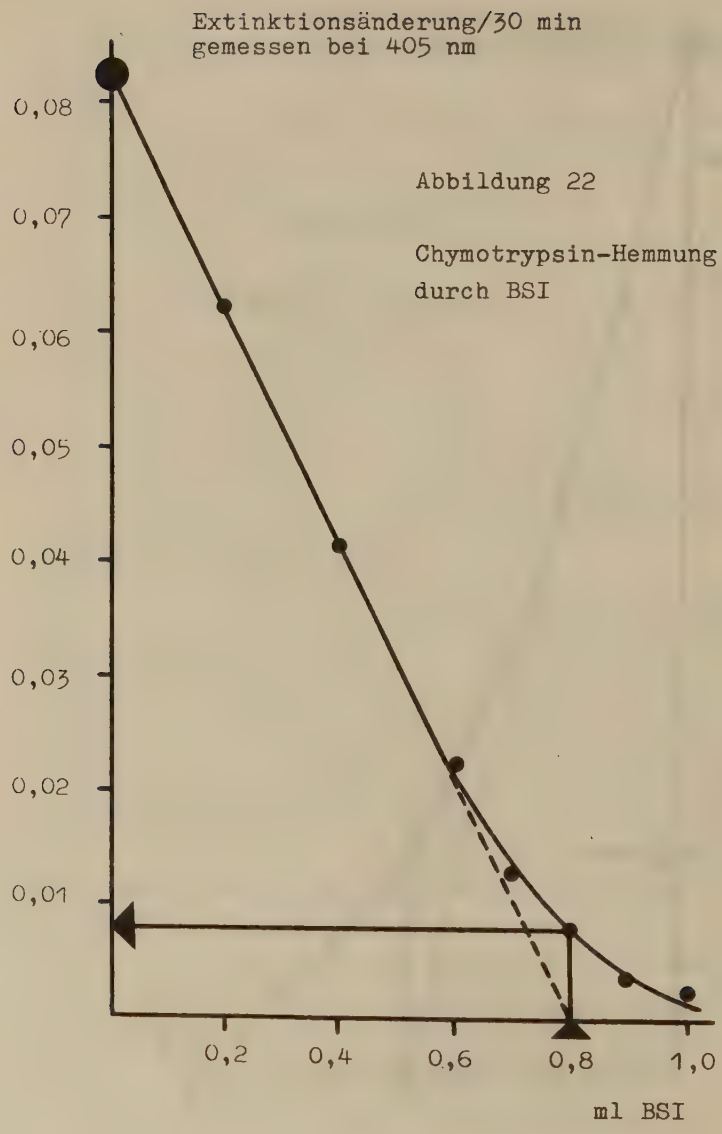


Abbildung 22

Chymotrypsin-Hemmung
durch BSI

b) Die säurestabilen Plasma-Trypsin-Inhibitoren (I 34 und I 17)

Aus Abbildung 23 - 26 berechneten wir die Hemmkonstanten beider Inhibitoren:

I 17

$K = 9{,}37 \times 10^{-10}$ Mol/l (Trypsin-Hemmung)
$K = 12{,}07 \times 10^{-9}$ Mol/l (Chymotrypsin-Hemmung)

I 34

$K = 13{,}98 \times 10^{-10}$ Mol/l (Trypsin-Hemmung)
$K = 16{,}68 \times 10^{-9}$ Mol/l (Chymotrypsin-Hemmung)

$$\text{I 17} : \frac{\text{K des Chymotrypsin-Komplexes}}{\text{K des Trypsin-Komplexes}} = 12{,}88$$

$$\text{I 34} : \frac{\text{K des Chymotrypsin-Komplexes}}{\text{K des Trypsin-Komplexes}} = 11{,}93$$

Da sich die Hemmkonstanten des I 17 um den Faktor 12,88 unterscheiden, ist anzunehmen, daß der I 17 mit Trypsin weitaus beständigere Komplexe bildet als mit Chymotrypsin. Deshalb ist das Trypsin in der Lage, an I 17 gebundenes Chymotrypsin freizusetzen und mit dem Inhibitor einen stabileren Komplex zu bilden.
So erreicht der Chymotrypsin-I 17-Komplex im Trypsin-Hemmtest nahezu 60 % der Hemmaktivität des freien Inhibitros (Abb. 20). Trypsin kann anscheinend mehr als die Hälfte des komplexierten Chymotrypsins freisetzen.
Aus dem Vergleich mit den Untersuchungsergebnissen der Enzym-BSI-Komplexe zogen wir nun folgende Schlüsse: Die Hemmwirkung eines Enzym-Inhibitor-Komplexes auf ein noch freies Enzym ist mit dem

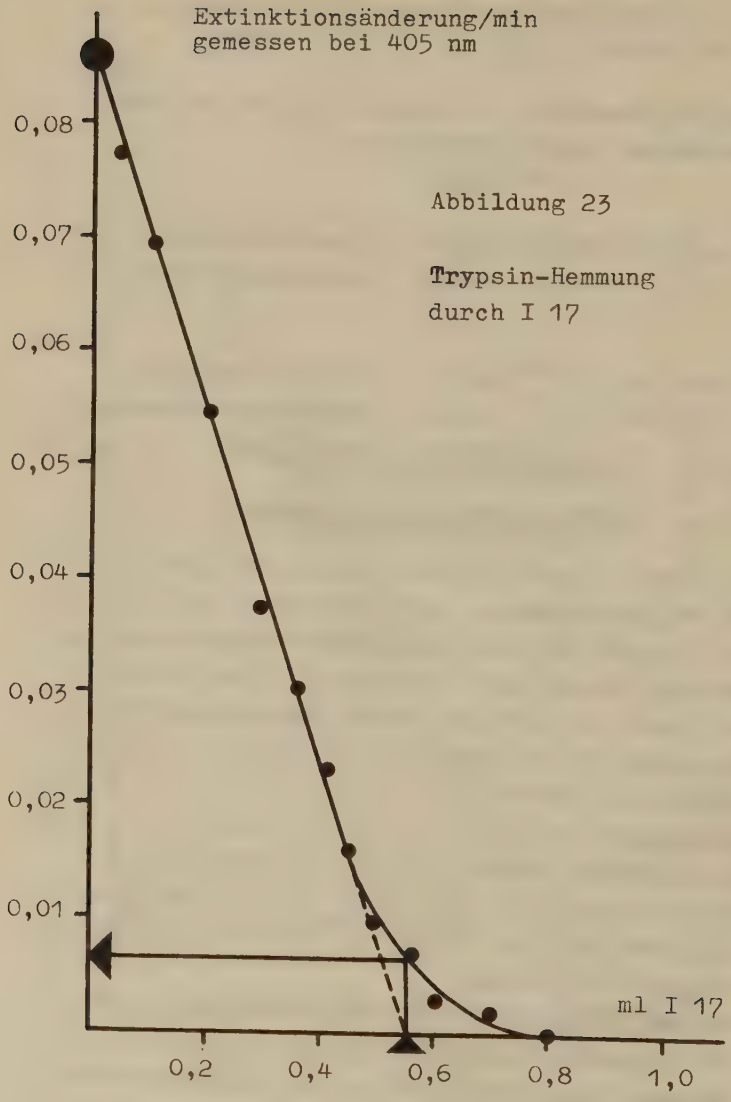


Abbildung 23

Trypsin-Hemmung
durch I 17

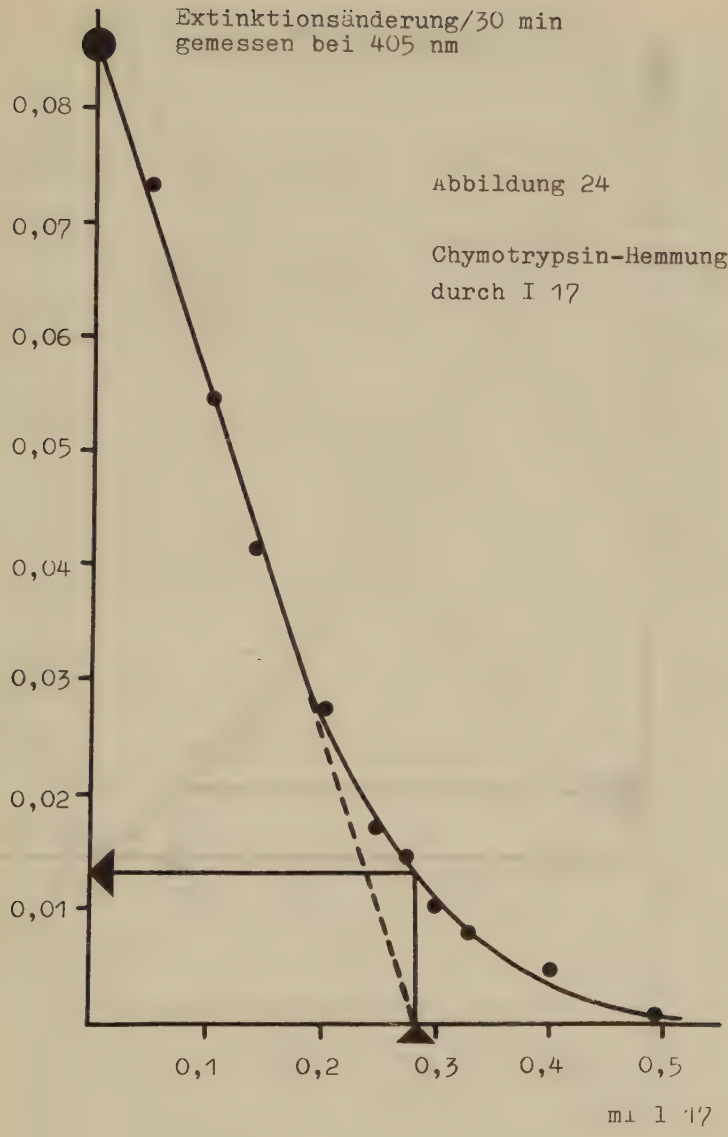


Abbildung 24

Chymotrypsin-Hemmung
durch I 17

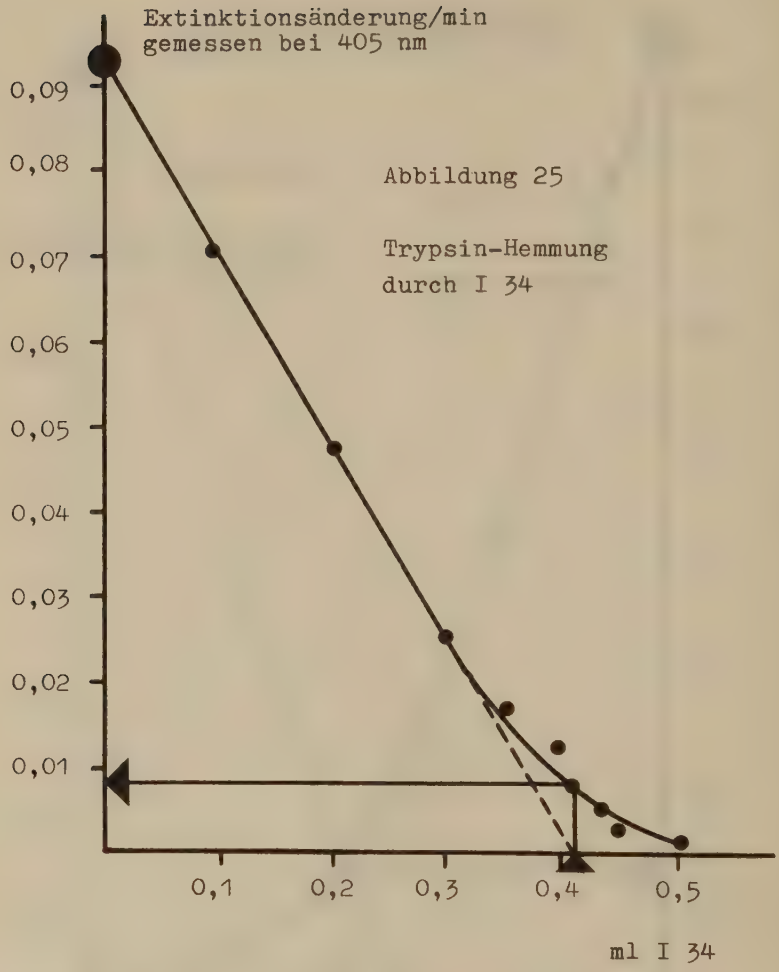


Abbildung 25

Trypsin-Hemmung
durch I 34

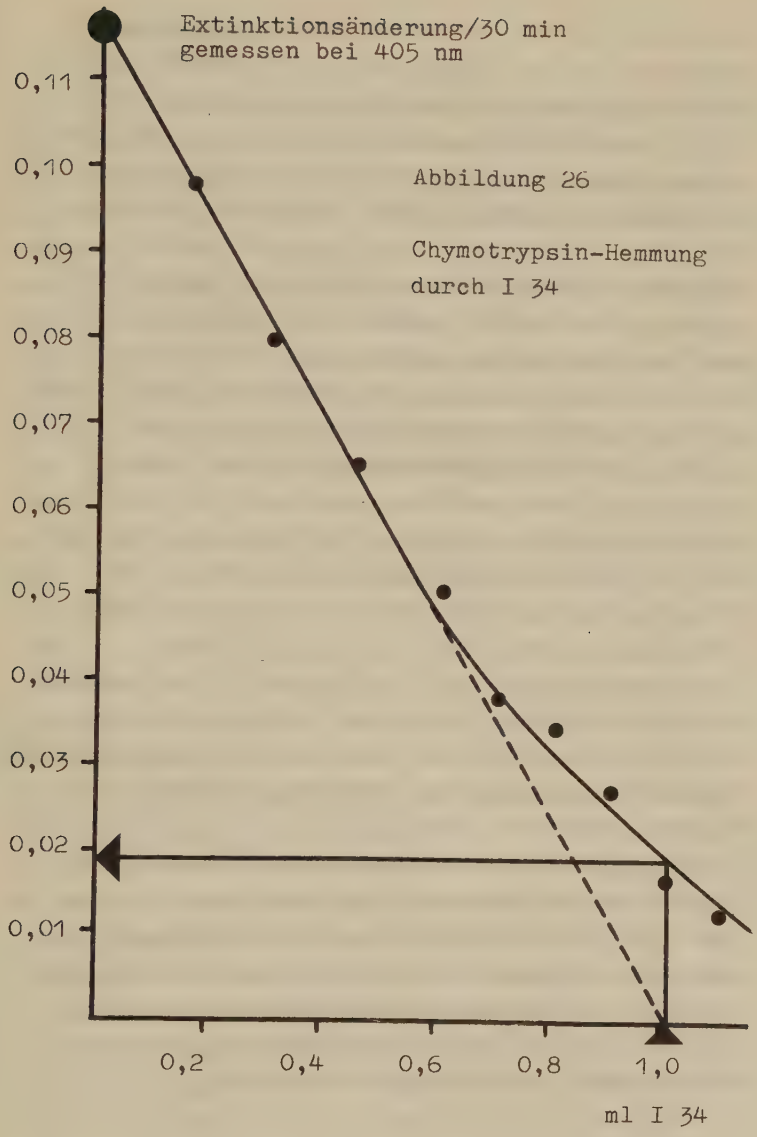


Abbildung 26

Chymotrypsin-Hemmung
durch I 34

Größenunterschied der beiden Inhibitorkonstanten korreliert, d. h., je größer die Dissoziationskonstante eines bereits vorliegenden Enzym-Inhibitor-Komplexes ist verglichen mit der eines Komplexes, den ein noch freies Enzym mit dem schon gebundenem Inhibitor bildet, desto mehr des komplexierten Enzyms kann durch die anfangs freie Protease verdrängt werden. Diese wird dabei in zunehmendem Maße selbst gehemmt.
Auch bei dem physiologischerweise vorkommenden, säurestabilen Plasma-Trypsin-Inhibitor (I 34) steht die Trypsinhemmung stark im Vordergrund. Der Quotient aus den beiden Hemmkonstanten liegt in derselben Größenordnung wie bei dem I 17. Die Chymotrypsin- und Trypsin-I 34-Komplexe verhalten sich im Trypsin- und Chymotrypsin-Hemmtest mit Sicherheit genauso wie die entsprechenden Enzym-I 17-Komplexe.
Bei der Umwandlung des I 34 in den I 17 durch die Inkubation mit überschüssigem Trypsin wird offensichtlich ein für das Hemmverhalten unwesentlicher Teil der Peptidkette des I 34 abgespalten (siehe auch Kapitel I).
Auffallend ist, daß die Hemmkonstanten des I 17 jeweils um den Faktor 0,7 geringer sind als die des I 34. Vermutlich wird durch die Verkleinerung des Inhibitormoleküls der Zutritt einer Protease zum aktiven Zentrum des Inhibitors erleichtert. Bezüglich seiner Hemmwirkung weist also der I 17 eine etwas günstigere Raumstruktur auf.

D. Zusammenfassung

Das Inter-Alpha-Antitrypsin stellt den "precursor" der säurestabilen Serum- und Harn-Inhibitoren, vermutlich sogar des säurestabilen Bronchialsekret-Inhibitors dar. Der im nativen Serum und Harn nachweisbare Inhibitor wird wohl durch das Enzym Kallikrein, welches in der Niere offenbar eine große Rolle spielt, freigesetzt.

Neben diesem physiologischerweise in Serum und Harn vorkommenden Hemmstoff mit Molakulargewicht 34.000 (I 34), ist es durch Trypsinbehandlung möglich, sowohl aus dem Inter-Alpha-Antitrypsin als auch aus dem I 34 einen zweiten säurestabilen Inhibitor mit Molekulargewicht 17.000 (I 17) freizulegen, der mit dem früher durch Affinitätschromatographie aus Serum und Harn isolierten Inhibitor identisch ist. Der I 17 scheint jedoch im physiologischen Milieu nicht vorzukommen; er muß deshalb als ein Kunstprodukt angesehen werden.

Im weiteren untersuchten wir die Komplexierbarkeit und die Hemmspezifität der säurestabilen Proteasen-Inhibitoren des Bronchialsekrets, des Serums und des Harns: Sie besitzen durchwegs nur ein aktives Zentrum, d. h., sie bilden im Sinne einer äquimolaren Reaktion nur binäre Komplexe. Der Bronchialsekret-Inhibitor verbindet sich bevorzugt mit der Protease Chymotrypsin; aber auch seine Trypsin-Komplexe sind relativ stabil. Bei dem I 34 und I 17 steht dagegen die Trypsin-Hemmung stark im Vordergrund. Die Chymotrypsin-Inhibitor-Komplexe sind unbeständig und zerfallen in Gegenwart von freiem Trypsin unter Bildung von Trypsin-Inhibitor-Komplexen.

I. Materialien und Methoden

I. Materialien

1) Enzyme

Chymotrypsin	(vom Rind)	TLCK-behandelt, lyophilisiert
Trypsin	(vom Rind)	TPCK-behandelt, lyophilisiert
Kallikrein	(vom Schwein)	Pankreas-Kallikrein, lyophilisiert

2) Substrate

N-Benzoyl-L-arginin-4-nitroanilid-hydrochlorid
= L-BAPA, Substrat des Trypsins
Succinyl-L-phenylalanin-p-nitroanilid
= SUPHEPA, Substrat des Chymotrypsins

3) Antikörper

Anti-Inter-Alpha-Trypsin-Inhibitor-Serum
Anti-Alpha-1-Antitrypsin-Serum
Anti-Alpha-2-Makroglobulin-Serum
Anti-C-1-Inaktivator-Serum
Anti-Alpha-1-Antichymotrypsin-Serum
Anti-Human-IgG-Serum

Sämliche Antikörper stammten vom Kaninchen und wurden von den Behringwerken bezogen.

4) Puffer-Lösungen

0,2 M Triäthanolamin-HCl Puffer, pH 7,8 (TRA-Puffer) (Verwendungszweck: Ansätze der kinetischen Enzym-Hemmtests).
0,05 M Boratpuffer, pH 8,0, enthaltend 0,2 NaCl (Verwendungszweck: Die Untersuchungsmaterialien wurden auf Sephadex in Boratpuffer fraktioniert).
Barbituratpuffer (siehe unter Methoden)

5) Molekularsiebchromatographen

Sephadex G 75, G 100, G 150, G 200; aufgeschlämmt in Boratpuffer, zu einer Säule (3 x 150 cm) gegossen.

6) Standard-Serum

ITI-Konzentration: 45 mg %
Bezugsquelle: Behringwerke

II. Methoden

1) Trypsin-Hemmtest

Um den Inhibitorgehalt einer Lösung genau feststellen zu können, ist es erforderlich, eine vom Inhibitor hemmbare, definierte Proteasenmenge ein geeignetes Substrat verdauen zu lassen. Die bei der Spaltung entstandenen Substratbruchstücke können photometrisch durch Extinktionsänderung nachgewiesen werden. Es besteht eine Beziehung zwischen der Zeiteinheit der Messung und der Quantität der entstandenen Spaltprodukte. Bei der Zugabe von Inhibitorlösung wird eine Abnahme der Extinktionsänderung in der Zeiteinheit gemessen. Diese Verminderung der Extinktionsdifferenz gegenüber dem Leerwert (Spaltansatz ohne Inhibitor) ist ein Maß für den Inhibitorgehalt der Lösung.

In eine Küvette pipettierten wir:	Inhibitor-Ansatz	Trypsin-Vergleichs-Ansatz
Trypsin-Lösung Konzentration im Test: 6,6 mU/ml	0,2 ml	0,2 ml
Puffer-Lösung Konzentration im Test: 110 mM TRA, 11 mM Ca^{++}	1,7 ml	1,8 ml
Probe (Inhibitor)	0,1 ml	-
mischen, 5 min vorinkubierten		
Substrat-Lösung Konzentration im Test: 0,77 mM L-BAPA	1,7 ml	1,0 ml

mischen, 5 min lang jede min Extinktion ablesen

Meßwellenlänge 405 nm; Schichtdicke 1 cm; Testvolumen: 3 ml; 25° C (thermokonstanter Küvettenhalter); Messung gegen Luft

Berechnung:

1 mU Trypsin entspricht einer Extinktionsänderung von 0,00664 pro min im 3-ml-Ansatz. Entsprechend hemmt eine Inhibitor-Millieinheit (1 ImU) für Trypsin den minütlichen Extinktionswert um den selben Betrag. Der Inhibitorgehalt der eingesetzten Probe ist:

$$\frac{(E/min)_{Tr} - (E/min)_{I}}{0,00664} \quad \text{in ImU}$$

2) Chymotrypsin-Hemmtest

In eine Küvette pipettierten wir:

Chymotrypsin-Lösung Konzentration im Test: Ca. 67 ug/ml = 3,3 mU/ml	0,2 ml
Puffer-Lösung (siehe oben)	1,7 ml (1,8 ml im Vergleichssatz)
Probe (Inhibitor)	0,1 ml

mischen, 5 min vorinkubieren

Substrat-Lösung Konzentration im Test: 4,3 mM SUPHEPA	1,0 ml

mischen, nach 0, 15 und 30 min die Extinktion ablesen und in E/min umrechnen.

Meßbedingungen siehe oben.

Berechnung:

1 mU Chymotrypsin entspricht einer Extinktionsänderung von 0,00332 pro min im 3-ml-Ansatz. Der Inhibitorgehalt der eingesetzten Probe errechnet sich folgendermaßen:

$$\frac{(E/min)_{Ctr} - (E/min)_{I}}{0,00332} \quad \text{in ImU}$$

3) Elektroimmundiffusion nach Laurell

Das Antigen wandert im elektrischen Feld in einem antikörperhaltigen Agarosegel-Medium. Dazu werden Glasplatten (10 x 10 cm) mit folgender Lösung beschickt:

	6,0 ml	2 % Agarose in aqua dest. (bis zum Sieden erhitzt)
+	0,25 ml	Antikörper-Lösung
+	6,0 ml	Barbituratpuffer (1,5 g % Na-Barbiturat, 0,28 g % Barbitursäure in aqua dest., pH 8,6)
=	12,25 ml	

In das Gel stanzt man nach dem Erstarren Löcher (Durchmesser 3 mm), in welche die Antigenlösung eingefüllt wird. Nach einer Laufzeit von etwa 6 Stunden bei 150 V entstehen zungenförmige Präzipitate, die zur Anode gerichtet sind. Die Länge dieser Präzipitate ist in gewissen Grenzen proportional zur aufgetragenen Menge des Antigens.

4) Eindimensionale Immunelektrophorese

Glasplatten werden mit folgender Lösung beschickt: (Plattengröße: 2,5 x 6,5 cm)

	1,5 ml	2 % Agarose in aqua dest. (bis zum Sieden erhitzt)
+	1,5 ml	Barbituratpuffer (Zusammensetzung wie oben)
=	3,0 ml	

Nach dem Absetzen stanzt man eine Rinne und zwei Löcher mittels einer Stanzform. Nun werden aus den Löchern die Agarstückchen entfernt und die Antigenlösung aufgetragen. Die Laufzeit beträgt ca. 1 Stunde bei 350 V. Dann wird die vorgeschnittene Rinne mit einem Gelmesser entfernt und mit Antiserum aufgefüllt, welches man 18 - 24 Stunden bei

Raumtemperatur gegen die gewünschten Antigene diffundieren läßt. Es entstehen sichelförmige Präzipitate.

5) Immundiffusion nach Ouchterlony

Mit demselben Medium wie bei der eindimensionalen Immunelektrophorese werden Glasplatten (4,0 x 4,0 cm) beschichtet. Nach dem Erstarren stanzt man Löcher (Durchmesser 3 mm) in rosettenförmiger Anordnung und mit einem Abstand von maximal 5 mm. Das zentrale Loch wird mit Antigenlösung gefüllt, während in die umliegenden Löcher die entsprechenden Antiseren gebracht werden. Die Diffusion erfolgt 18 - 24 Stunden lang bei Raumtemperatur. Falls es zu einer Antigen-Antikörper-Reaktion kommt, bilden sich strichförmige Präzipitate.

F. Literaturverzeichnis

1) Bernhard, S.A., J. Cellular Comp. Physiol. 54, 195 (1959)

2) Erlanger, B.F., Proc. Nat. Acad. Sci. US 46, 1430 (1960)

3) Faarvang, H.J., The urinary trypsininhibitor in man (meningin), Scand. J. clin. Lab. Invest. 17, 1 (1965)

4) Fall, J., Dissertation, Med. Fak. Univ. München (1974)

5) Frey, E. K., Arch. klin. Chir. 142, 663 (1926)

6) Fritz, H., E. Fink, M. Gebhard, K. Hochstrasser, E. Werle, Z. physiol. Chem. 350, 933 (1969)

7) Haynes, R., R.E. Reeney, Biochemistry 7, 2546 (1968)

8) Hochstrasser, K., Habilitationsschrift, Med. Fak. Univ. München (1969)

9) Hochstrasser, K., E. Werle, Z. physiol. Chem. 249, 350 (1969)

10) Hochstrasser, K., Clinical Enzymology, pp. 57 - 60 (1970)

11) Hochstrasser, K., R. Reichert, N. Heimburger, Z. physio. Chem. 354, 587 (1973)

12) Hochstrasser, K., H. Feuth, K. Hochgesand, Bayer-Symposium V "proteinase inhibitors" (1974)

13) Hochstrasser, K., H. Feuth, J. Fall, B. Kemkes, Säurestabile Proteaseninhibitoren im Blutplasma bei versch. Nephropathien, Klin. Wschr. 52, 1015 - 1017 (1974)

14) Hochstrasser, K., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. Bd. 356 1865 - 1877 (1975)

15) Horton, E. W., In: M. Schachter, Polypeptides which affect Smooth Muscles and Blood Vessels, Pergamon Press 263 (1960)

16) Kraut, H., E.K. Frey, E. Werle, F. Schultz, Z. physiol. Chem. 230, 259 (1934)

17) Laskowsky, M. sr., F. C. Wu, J. biol. Chem. 204, 797 (1953)

18) Mansfeld, V. A., Ziegelhöffer, Z. Horakova, J. Hladovec, Naturwissenschaften 46, 172 (1959)

19) Proksch, G.J., J.I. Routh, The purification of the trypsininhibitor from human pregnancy urin, J. Lab. clin. Med. 79, 491 (1972)

20) Proksch, G.J., J.I. Routh, J.M. Smith, Immunological relationship of the urinary trypsininhibitor to a plasma alpha-globulin, Clin. Biochem. 5, 242 (1972)

21) Proksch, G.J., J. Lanci, G.B. Norschow, Interrelation of the urinary trypsininhibitor to plasma inter-alpha-trypsin-inhibitor, Clin. Biochem. 6, 200 (1973)

22) Reichert, R., K. Hochstrasser, G. Conradi, Unterscuhung zur Proteasenhemmkapazität des menschlichen Bronchialsekrets, Pneumologie 147, 13-20 (1972)

23) Reichert, R., K. Hochstrasser, E. Werle, Nachweis eines niedermolekularen Proteaseninhibitors im menschlichen Bronchialsekret, Z. Laryng. Rhinol. 190 - 193 (1972)

24) Rühlmann, A., D. Kukla, P. Schwager, K. Bartels und R. Huber, J. Mol. Biol. 77, 417 - 436 (1973)

25) Schettler, G., Innere Medizin I 264 (1972)

26) Sealock, R.B., R. Laskowsky jr., Biochemistry 8, 3703 (1969)

27) Shain, Y., A.M. Mayer, Physiol. Plant. 18, 853 (1965)

28) Steiner, R.F., Nature 204, 579 (1964)

29) Steiner, R.F., Biochem. Biophys. Acta 100, 111 (1965)

30) Vogel, R., I. Trautschold, E. Werle, Natürliche Proteinasen-Inhibitoren, Thieme Verlag (1966)

31) Werle, E., R. Vogel, M. Hutzel, unveröffentlicht

32) Werle, E., R. Vogel, Arch. int. Pharmacodyn. 126, 171 (1960)

33) Werle, E., R. Vogel, Arch. int. Pharmacodyn. 131, 257 (1961)

34) Werle, E., Neue Asp. d. Tras. Therapie, Bd. 3, 49 (1969)

L E B E N S L A U F

Am 11. August 1952 wurde ich, Wolfgang Eduard Hilla, in Wartaweil bei Herrsching als Sohn von Eduard Hilla und Elisabeth Hilla geboren.

Im Herbst 1958 trat ich in unserem Wohnort Olching in die dortige Volksschule ein. Nach vierjährigem Besuch wechselte ich im Herbst 1962 in die Oberrealschule München-Pasing. Dort legte ich im Frühjahr 1971 die Reifeprüfung ab.

Im Herbst des gleichen Jahres trat ich an der Ludwig-Maximilians-Universität das Studium der Humanmedizin an. Der naturwissenschaftlichen Vorprüfung unterzog ich mich nach dem Sommersemester 1972 und der ärztlichen Vorprüfung nach dem Wintersemester 1973/74. Nach dem Wintersemester 1974/75 legte ich den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung ab.

Den zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung absolvierte ich im März 1977. Daraufhin wurde ich im Praktischen Jahr zunächst acht Monate im Lehrkrankenhaus Landshut (Innere Medizin und Chirurgie) und dann vier Monate im Klinikum Großhadern (Wahlfach Neurologie) ausgebildet. Den dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung bestand ich am 27. April 1978 in München.